

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización del componente proteico de la
especialidad farmacéutica Inmunoferon®**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Javier Varela Espinosa

Director

Guillermo Giménez Gallego

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización del componente proteico de la
especialidad farmacéutica Inmunoferon[®]**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Javier Varela Espinosa

Director

Guillermo Giménez Gallego

Madrid, 2015

A mis padres, mi mujer, y mis hijas

Esta tesis ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Prof. Guillermo Giménez Gallego, a quien quiero expresar mi más sincero agradecimiento por la confianza depositada en mí, por los conocimientos que me ha transmitido y por su constante apoyo. De su mano he recorrido un largo camino, durante el cual se ha preocupado de dirigir mis pasos en la dirección adecuada, orientándome cada vez que he necesitado sus consejos, muy especialmente en la fase final de elaboración de este trabajo científico en la que, pese a su apretada agenda, siempre ha encontrado un hueco para atenderme. Ha sido un privilegio para mí tener un director de tesis de su valía científica y humana.

Asimismo, quiero mostrar mi agradecimiento:

A María Luisa Navarro y a María Fernández, por su inestimable ayuda y colaboración durante la fase experimental de este proyecto.

A mis compañeras del servicio de Química de Proteínas Emilia y Cristina, por su comprensión y su apoyo en el trabajo diario.

A mis compañeros y amigos del CIB, los que están y los que se fueron, que durante tanto tiempo me han animado para que, de una vez por todas, me sentara a escribir esta tesis. Merecen una mención especial aquellos que me ayudaron durante la redacción de este documento facilitándome información, resolviendo mis dudas o asistiéndome en la edición. La lista sería demasiado extensa para nombrarlos a todos y, de seguro, cometería algún olvido inintencionado. Gracias a todos por vuestro aliento.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia por estar siempre a mi lado, a pesar de las muchas horas que les he robado para que esta tesis haya podido ver la luz.

La presente tesis ha sido realizada bajo el auspicio de un contrato de investigación firmado entre el Centro de Investigaciones Biológicas e Industrial Farmacéutica Cantabria (S.A).

- ÍNDICE -

SUMMARY	i
RESÚMEN	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades del sistema inmune	1
1.1.1. Inmunidad innata o no específica	2
1.1.2. Inmunidad adaptativa o específica	3
1.2. Inmunomodulación	6
1.2.1. Tipos de inmunomoduladores	8
1.2.1.1. Citoquinas	8
1.2.1.1.1. Interleuquinas	9
1.2.1.1.2. Interferones	9
1.2.1.1.2. Interferones	9
1.2.1.1.3. Factores estimulantes de colonias	10
1.2.1.2. Anticuerpos monoclonales	10
1.2.1.3. Análogos de receptores solubles	11
1.2.1.4. Inmunomoduladores naturales	12
1.2.1.4.1. Bacilo de Calmette y Guérin (BCG)	12
1.2.1.4.2. Polypodium leucotomos	13
1.3. Immuferon [®]	13
1.3.1. Definición	13
1.3.2. Propiedades inmunomoduladoras	13
1.3.3. Aplicaciones terapéuticas	14
1.3.3.1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	15
1.3.3.2. Estomatitis aftosa recidivante	15
1.3.3.3. Tuberculosis	16
1.3.3.4. Hepatitis B crónica	16
1.3.3.5. Adyuvante	17

- ÍNDICE -

2. OBJETIVOS	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Cepas bacterianas y plásmidos	25
3.2. Oligonucleótidos sintéticos	26
3.3. Medios y condiciones de cultivo	26
3.3.1. Medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972)	27
3.3.2. Medio mínimo M9	27
3.3.3. Medio mínimo M9-casaminoácidos	27
3.3.4. Antibióticos	27
3.3.5. Condiciones de cultivo	28
3.3.6. Conservación de las cepas bacterianas	28
3.4 Técnicas de manipulación de DNA	28
3.4.1. Aislamiento de plásmidos y fragmentos de DNA	28
3.4.2. Digestión del DNA con enzimas de restricción	28
3.4.3. Ligación del DNA	29
3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa	29
3.4.5. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa (PCR)	30
3.4.6. Secuenciación de DNA	30
3.4.7 Síntesis y clonación del cDNA codificante para AM55 mediante reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa (PCR)	31
3.5. Técnicas de manipulación bacteriana	32
3.5.1. Obtención de células competentes de <i>E. coli</i>	32
3.5.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	33
3.5.3. Análisis de los transformantes	33
3.5.4. Inducción de la expresión de AM55	34
3.5.5. Expresión de AM55 marcada con ¹⁵ N	34
3.6. Técnicas de manipulación de proteínas	35
3.6.1 Purificación de AM55 y AM56	35
3.6.2. Aislamiento de las subunidades de AM55 y AM56	36
3.6.3. Purificación de AM55 recombinante	36
3.6.4. Obtención de proteínas intracelulares	37

- ÍNDICE -

3.6.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)	38
3.6.6. Reducción y carboximetilación de AM55	39
3.6.7. Transferencia electroforética de proteínas	40
3.6.8. Immunodetección	40
3.7. Análisis de aminoácidos	41
3.8. Secuenciación automática de proteínas	41
3.9. Espectrometría de masas	42
3.10. Espectros de absorción ultravioleta	42
3.11. Espectros de dicroísmo circular	43
3.12. Búsqueda de homología de secuencia y alineamiento con proteínas homólogas	43
3.13. Ensayos de estabilidad frente a proteasas	44
3.13.1 Hidrólisis con tripsina	44
3.13.2. Hidrólisis con quimotripsina	44
3.13.3. Hidrólisis con pepsina	44
3.13.4 Hidrólisis con termolisina	44
4. RESULTADOS	47
4.1 Aislamiento y purificación de los polipéptidos constituyentes de AM5	47
4.1.1. Separación de las cadenas de AM55 y AM56	50
4.1.2. Espectrometría de masas. Determinación de la masa molecular	52
4.1.3. Composición de aminoácidos de AM55 y AM56	54
4.1.4. Determinación de la secuencia NH ₂ -terminal de AM55 y AM56	56
4.1.5. Identificación de AM 57	57
4.2. Estudios estructurales a baja resolución	60
4.2.1. Estructura secundaria de AM55 y AM56	60
4.2.2. Estabilidad estructural de AM55 y AM56	63
4.2.2.1. Desnaturalización inducida por agentes químicos	63
4.2.2.2. Estabilidad frente a cambios de pH y temperatura	66
4.3. Ensayos <i>in vitro</i> de resistencia frente a proteasas	68
4.4. Clonación de AM55	72

- ÍNDICE -

4.4.1. Construcción pHAT2-AM55	74
4.4.1.1. Expresión	76
4.4.2. Construcción pINompA-AM55	78
4.4.2.1. Expresión	80
4.4.2.2. Expresión de la proteína etiquetada con ¹⁵ N	83
4.4.2.3. Purificación de AM55 recombinante	84
4.5. Caracterización molecular de rAM55	86
4.5.1. Espectrometría de masas	86
4.5.2. Análisis de aminoácidos y degradación secuencial de Edman	87
4.5.3. Dicroísmo circular	88
4.5.4. Digestión con pepsina	89
5. DISCUSIÓN	93
5.1. Aislamiento e identificación de los polipéptidos de AM5	93
5.2. Estudio estructural de AM55 y AM56	98
5.3. Resistencia frente a digestión por proteasas	101
5.4. Expresión	104
5.5. Expresión de la proteína etiquetada con ¹⁵ N	110
6. CONCLUSIONES	115
7. BIBLIOGRAFÍA	119
8. ANEXO	141

SUMMARY

INTRODUCTION

The immune system is the body's defence system involved in protection against micro-organisms, pathogens and neoplasia. This system is comprised of a large variety of cells and molecules able to specifically recognise molecular structures or antigens and carry out an immune response that leads to their removal. However, at times this response may be altered leading to diseases arising from insufficient response (immunodeficiency, infection, and neoplasia) or excessive response (allergy, autoimmunity, transplant rejection). The therapeutic strategy used to restore correct operation of the immune response, either by stimulating or suppressing it, is known as immunomodulation. Highly varied immunomodulator agents are used to attain immunomodulation; these include synthetic, recombinant and natural origin substances. Within the latter group immunomodulators designed with the aim of stimulating natural immunity mechanisms are notable. The Spanish drug Immuferon[®] belongs to this group. This is an oral immunomodulator which has proved its ability to normalise the effector function of accessory and phagocytic cells, natural killer cells and T lymphocytes. At the same time it inhibits the production of TNF- α and modulates the production of other regulatory cytokines (IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ). It has been used in various diseases such as chronic hepatitis B, chronic obstructive pulmonary disease, aphthous stomatitis and muscular inflammation, among others.

The active substance of the specialty Immuferon[®] is a non-covalent association of polysaccharide/protein absorbed on a stabilising matrix of calcium sulphate and phosphate. The polysaccharide is a glucomannan from the *Candida utilis* wall and the protein component arises from non-germinated ricin seeds (*Ricinus communis*). To date, the total lack of knowledge over the nature of this protein component has hindered studying and ascertaining in depth the complex pharmacology of this drug.

OBJECTIVES

- 1- To obtain the different polypeptides comprising the organic component (AM5) of the active substance (AM3) of the pharmaceutical specialty Immunoferon® to perform its molecular identification and characterisation.
- 2- Structural analysis of secondary structure by means of the circular dichroism technique of polypeptides isolated from AM5. This analysis will be completed with a study of the conformational stability of these polypeptides by performing denaturalisation experiments induced by chemical agents, temperature and pH.
- 3- Stability study compared to the most important proteins of the gastrointestinal tract.
- 4- Obtaining preparations of protein marked with ^{15}N , with suitable homogeneity to elucidate their three-dimensional structure at high resolution. With this purpose in mind the DNA sequence coding for the majority polypeptides present in AM5 will be designed; a system of expression that enables obtaining sufficient amount of these isotopically marked proteins will be carried out.

RESULTS

Analysis of the organic component of Immunoferon® by SDS-PAGE revealed the presence of three unique bands with apparent molecular mass ~20, 7.4 and 5.2 kDa. These three polypeptides, which we have called AM55, AM56 and AM57, were purified to homogeneity by means of a gel filtration chromatography stage followed by reverse phase column chromatography. Analysis by SDS-PAGE in the presence and absence of reducer agents revealed that AM55 and AM56 are heterodimers comprised of two subunits with size 6.2 and 4.6 kDa, and 5.2 and 3 kDa, respectively, bound by disulphide bridges, whilst AM57 is comprised of a single polypeptide chain with mass coinciding with that of the highest weight subunit of AM56.

AM55, AM56 and AM57 were analysed by means of techniques for analysing amino acids, terminal amino sequencing and mass spectrometry; AM55 was identified

as the reserve protein of ricin seeds (*Ricinus communis*) Ric c 3 (da Silva Jr. *et al.*, 1996, Bashir *et al.*, 1998). AM56 was also identified as the reserve protein of these seeds Ric c 1 (AM56, Sharief & Li 1982, Bashir *et al.*, 1998). These proteins belong to the family of albumins 2S and proceed from a common precursor polypeptide of 34 kDa whose proteolytic processing leads to mature proteins (Irwin *et al.*, 1990). Ric c3 is constituted by two chains of molecular masses 4 and 7 kDa, bound together by two disulphide bridges; there are also another two intracatenary bridges in the heavy chain. AM57 is exclusively constituted by the largest subunit of Ric c1.

Detailed analysis of the mass spectra of AM55, AM56 and their corresponding subunits, previously separated with DTT and purified by means of reverse phase chromatography, revealed the presence of some heterogeneity. We have been able to establish that the origin of this heterogeneity lies in the non-specific processing of the precursor polypeptide, specifically in the two segments that connect the chains, which in the case of AM56 produces protein forms with 1 or 2 additional amino acids, or 1 amino acid less on the carboxyl end of the light chain; in AM55 this gives rise to a form with 4 amino acids more on the carboxyl end of the light chain and another with 1 amino acid less on the carboxyl end of the heavy chain.

A structural study of proteins AM55 and AM56 was also performed whilst this work was carried out. Spectroscopic analysis revealed that these proteins have virtually identical native folding, with a predominance of α helix, typical of 2S albumins. Conformational stability was also evaluated as compared to the denaturalisation induced by chemical agents, temperature and pH. It has been verified that AM55 and AM56 have very stable native folding such that acid or base pH is not modified; nor is this affected by concentrations of urea 8M or GnCl 4M; nor is temperature modified from 90°C. To attain partial denaturalisation it is necessary to resort to the combined use of pH and temperature or urea and temperature, an effect boosted more in the presence of a reducer agent. Full loss of secondary structure is only attained in the presence of GnCl 8 M or after reduction with DTT and subsequent carboxymethylation of -SH groups. These results suggest that AM55 and AM56 have a very robust native structure in which hydrogen bridges do not play an essential role. It is the hydrophobic effect and disulphide bridges which are mainly responsible for their major stability.

We have also investigated the proteolytic susceptibility of AM55 and AM56 against pepsin, trypsin and chymotrypsin. *In vitro* digestion studies determine that both proteins are very resistant to the digestive action of the three proteases, which suggest that they are capable of crossing the alimentary canal without undergoing significant modifications to their structure.

Taken as a whole, these results demonstrate that the two most important proteins of the peptide component of Immunoferon[®], AM55 and AM56, have major conformational stability under the conditions the drug is subjected to after oral administration: this constitutes the basis for its ability to exercise its pharmacological action.

Determination of the three-dimensional structure of AM55 and AM56 is the first step to define the chemical structure of those regions responsible for their pharmacological activity. This kind of study required molecularly homogeneous and isotopically marked protein. With this purpose in mind we produced AM55 in *E.coli* as recombinant protein. First, a coding gene for AM55 was synthesised with an optimised composition of codons to direct synthesis of AM55 in *E. coli*. This gene was inserted into the vector pHAT2. It was verified that production of the protein is minimal and is also toxic for *E. coli* when it accumulates inside. The reducer environment of the *E. coli* cytoplasm hinders the expression of proteins which, like AM55, are rich in disulphide bridges, whereby we opted to use expression systems in which synthesis of the protein is coupled to its periplasm secretion. Specifically, the gene coding for AM55 was inserted into the vector pIN-III-*ompA*-2. With this system, AM55 accumulates mainly in the cell supernatant. However, the protein was not expressed in minimal culture medium because the *ompA* excretion system was repressed in these media. The toxicity of AM55 was used when accumulating in the intracellular medium, to select strains derived from *E. coli* BL21 which had the excretion system constitutively active. These supersecretory strains which we have called BL21-SS, are able to grow in a minimal medium with ammonium as a source of nitrogen and glucose as a source of carbon and they turn out to be even more efficient than those that grow in nutrient-rich media. With these strains, grown in ammonium chloride marked with ¹⁵N, we obtained AM55 labelled with ¹⁵N as a secretion product in the culture medium, from which it was

purified to homogeneity by means of two fractioning stages by precipitation with heat and ethanol, ion and cation exchange chromatography with a final yield of 20 mg per litre of culture.

The recombinant protein was characterised molecularly and structurally and demonstrated its total equivalence to the natural protein. This recombinant protein, marked with ^{15}N and highly homogeneous, was used to determine its three-dimensional structure at a resolution not attained up to now in which unmarked protein had to be used with the heterogeneity typical of natural products. This determination of the three-dimensional structure (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003) does not form part of this thesis.

CONCLUSIONS

- 1- The protein component of the active substance AM5 in the specialty Immuferon[®] is comprised of three polypeptides of ~12.3, 11.4 and 7.3 kDa, which we call AM55, AM56 and AM57, respectively. AM55 and AM56 are heterodimers comprised of two subunits of different size bound by disulphur bridges. AM57 is comprised of a single polypeptide chain.
- 2- AM55 and AM56 were identified as reserve proteins arising from the albumin family 2S, Ric c3 and Ric c1, respectively; AM57 was identified as the heavy chain of AM56.
- 3- Heterogeneity was detected in the AM55 and AM56 fractions in the mass spectrometry analysis. This heterogeneity is because of the non-specific processing of the common precursor polypeptide.
- 4- The secondary structure of AM55 and AM56 is virtually identical and consists of: 59% to 62% α helix, 3% β sheet, 11% to 12% β turns and 26% to 27% unordered. The secondary structure of the subunits comprising AM55 and AM56 lacks native-like structural elements. This suggests that disulphide bridges are essential to maintain the native structure of these proteins.

- 5- AM55 and AM56 are stable proteins compared to the denaturalisation induced by chemical agents, temperature and pH. Their native structure goes virtually unaltered in the presence of urea 8 M or GnCl 4 M; when pH is reduced to 2, or increases to 9; or when temperature increases up to 90°C. Full denaturalization, although reversible, is only obtained with GnCl 8 M. They are also resistant to hydrolysis with pepsin, trypsin or chymotrypsin. They suggest that they are able to cross the alimentary canal without undergoing significant alterations to their native structure.
- 6- Intracellular expression of AM55 entails *E. Coli* toxicity. It has been managed to over-express AM55 in a nutrient-rich medium using systems of periplasm expression based on vectors from the series pIN-III, in addition to strains of *E.coli* BL21. However, expression in a minimal medium with the system was not possible because of repression of the excretion system.
- 7- The new super-secretory strain BL21-SS, capable of growing in a minimal medium with a sole source of nitrogen and carbon, and simultaneously overproduce recombinant protein and secrete this into the culture medium, was isolated. The protein AM55 labelled with ^{15}N was produced from the strain. The protein was purified from the extracellular medium with a high yield (25 mg of rAM55 purified by liter of cell culture). It was possible to obtain the labelled protein by resolution of its three-dimensional structure by NMR with a resolution not attained in prior studies.

RESÚMEN

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es el sistema de defensa del organismo involucrado en la protección frente a microorganismos patógenos y neoplasias. Este sistema está formado por una gran variedad de células y moléculas capacitadas para reconocer específicamente estructuras moleculares o antígenos y desarrollar una respuesta inmune que conduce a su eliminación. Sin embargo, en ocasiones esta respuesta puede estar alterada provocando enfermedades derivadas de respuesta insuficiente (inmunodeficiencias, infección, neoplasias), o de respuesta excesiva (alergia, autoinmunidad, rechazo de trasplantes). La estrategia terapéutica utilizada para restaurar el correcto funcionamiento de la respuesta inmune, estimulándola o suprimiéndola, se conoce como inmunomodulación. Para lograr la inmunomodulación se utilizan agentes inmunomoduladores de naturaleza muy variada que incluyen sustancias sintéticas, recombinantes y de origen natural. Dentro de este último grupo cabe destacar a los inmunomoduladores diseñados con el objetivo de estimular mecanismos de inmunidad natural. A este grupo pertenece el fármaco español Inmunoferon[®]. Se trata de un inmunomodulador oral que ha demostrado capacidad para normalizar la función efectora de las células accesorias y fagocíticas, de las células NK y de los linfocitos T. Simultáneamente, inhibe la producción de TNF- α y modula la producción de otras citoquinas reguladoras (IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ). Se ha empleado en enfermedades diversas, como la hepatitis B crónica, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la estomatitis aftosa y la inflamación muscular, entre otras.

El principio activo de la especialidad Inmunoferon[®] es una asociación no covalente de polisacárido/proteína absorbida sobre una matriz estabilizante de sulfato y fosfato cálcicos. El polisacárido es un glucomanano de la pared de *Candida utilis* y el componente proteico procede de semillas no germinadas de ricino (*Ricinus communis*). Hasta el presente, el desconocimiento total de la naturaleza de este componente proteico ha impedido estudiar y conocer en profundidad la compleja farmacología de este fármaco.

OBJETIVOS

- 1- Obtención de los distintos polipéptidos constituyentes del componente orgánico (AM5) del principio activo (AM3) de la especialidad farmacéutica Inmunoferon[®] para realizar su identificación y caracterización molecular.
- 2- Análisis de la estructura secundaria mediante la técnica de dicroísmo circular de los polipéptidos aislados de AM5, con objeto de poder hacer una primera caracterización de las bases estructurales de sus propiedades biológicas y quimicofísicas.
- 3- Estudio de la estabilidad frente a las principales proteasas del tracto digestivo.
- 4- Obtención de preparaciones de proteína marcada con ¹⁵N, con homogeneidad adecuada para la determinación de su estructura tridimensional a alta resolución. Con este propósito se diseñará la secuencia de DNA que codifica para los polipéptidos mayoritarios presentes en AM5 y se desarrollará un sistema de expresión que permita obtener cantidad suficiente de estas proteínas marcadas isotópicamente.

RESULTADOS

El análisis del componente orgánico de Inmunoferon[®] mediante SDS-PAGE reveló la existencia de tres únicas bandas con masa molecular aparente ~20, 7.4 y 5.2 kDa. Estos tres polipéptidos, que hemos denominado AM55, AM56 y AM57, se purificaron a homogeneidad mediante una etapa de cromatografía de filtración en gel seguida de una cromatografía en columna de fase reversa. El análisis mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de agentes reductores evidenció que AM55 y AM56 son heterodímeros formados por dos subunidades de tamaño 6.2 y 4.6 kDa, y, 5.2 y 3 kDa, respectivamente, unidas por puentes disulfuro, mientras que AM57 consta de una única cadena polipeptídica de masa coincidente con la de la subunidad de mayor peso de AM56.

AM55, AM56 y AM57 se analizaron mediante las técnicas de análisis de aminoácidos, secuenciación amino terminal y espectrometría de masas, identificándose AM55 como la proteína de reserva de las semillas de ricino (*Ricinus communis*) Ric c 3 (da Silva Jr. *et al.*, 1996, Bashir *et al.*, 1998) y AM56 como la también proteína de reserva de estas semillas Ric c 1 (AM56, Sharif & Li 1982). Estas proteínas pertenecen a la familia de las albuminas 2S y proceden de un polipéptido precursor común de 34 kDa cuyo procesamiento proteolítico da lugar a las proteínas maduras (Irwin *et al.*, 1990). Ric c3 está constituida por dos cadenas de masas moleculares de 4 y 8 kDa y Ric c 1 por otras dos de 4 y 7 kDa, unidas por dos puentes disulfuro, existiendo además otros dos puentes intracatenarios en la cadena pesada. AM57 estaría constituida exclusivamente por la subunidad de mayor tamaño de Ric c1.

El análisis detallado de los espectros de masas de AM55, AM56 y de sus correspondientes subunidades, previamente separadas con DTT y purificadas mediante cromatografía de fase reversa, mostró la existencia de cierta heterogeneidad. Hemos podido establecer que el origen de esta heterogeneidad reside en el procesamiento inespecífico del polipéptido precursor, concretamente en los dos segmentos que conectan las cadenas, lo que en el caso de AM56 produce formas de la proteína con 1 o 2 aminoácidos adicionales, o 1 aminoácido de menos, en el extremo carboxilo de la cadena ligera; y en AM55 da lugar a una forma con 4 aminoácidos de más en el extremo carboxilo de la cadena ligera, y otra con 1 aminoácido de menos en el carboxilo de la cadena pesada.

Durante el desarrollo de este trabajo también se ha realizado un estudio estructural de las proteínas AM55 y AM56. El análisis espectroscópico evidenció que estas proteínas poseen un plegamiento nativo virtualmente idéntico, con predominio de hélice α , típico de las albuminas 2S. También se evaluó la estabilidad conformacional frente a la desnaturalización por agentes químicos, temperatura y pH. Se ha podido comprobar que AM55 y AM56 tienen un plegamiento nativo muy estable, de forma que no se altera a pH ácido o básico; que tampoco se afecta por concentraciones de urea 8 M o de GdnCl 4 M; ni se perturba a temperatura de 90°C. Para conseguir la desnaturalización parcial es necesario acudir al uso combinado de pH y temperatura o urea y temperatura, efecto que se potencia algo más en presencia de un agente reductor.

Únicamente en presencia de GnCl 8 M o tras la reducción con DTT y posterior carboximetilación de los grupos $-\text{SH}$ se alcanza la pérdida completa de estructura secundaria. Estos resultados indican que AM55 y AM56 poseen una estructura nativa muy robusta en la que los puentes de hidrogeno no juegan un papel esencial, y son, el efecto hidrofóbico y los puentes disulfuro, los principales responsables de su gran estabilidad.

También hemos investigado la susceptibilidad proteolítica de AM55 y AM56 frente a pepsina, tripsina y quimotripsina. Los ensayos de digestión *in vitro* determinaron que ambas proteínas son muy resistentes frente a la acción digestiva de las tres proteasas, lo que sugiere que son capaces de atravesar el tubo digestivo sin sufrir modificaciones significativas en su estructura.

En conjunto, estos resultados demuestran que las dos proteínas mayoritarias del componente peptídico de Inmunoferon[®], AM55 y AM56, poseen una gran estabilidad conformacional en las condiciones a las que se ve sometido el fármaco tras la administración por vía oral, lo que constituye la base de su capacidad para ejercer su acción farmacológica.

La determinación de la estructura tridimensional de AM55 y AM56 es el primer paso para definir la estructura química de aquellas regiones responsables de su actividad farmacológica. Este tipo de estudios requiere proteína molecularmente homogénea y marcada isotópicamente. Con este fin hemos producido AM55 en *E.coli* como proteína recombinante. En primer lugar se ha sintetizado un gen codificador de AM55 con una composición de codones optimizada para dirigir la síntesis de AM55 en *E. coli*. Este gen se ha insertado en el vector pHAT2. Se ha podido comprobar que la producción de la proteína es mínima y además resulta tóxica para *E. coli* cuando se acumula en su interior. El ambiente reductor del citoplasma de *E. coli* dificulta la expresión de proteínas que, como AM55, son ricas en puentes disulfuro, por lo que hemos optado por utilizar sistemas de expresión en los que la síntesis de la proteína va acoplada a su secreción periplasmática. En concreto, el gen el gen codificante para AM55 se ha insertado en el vector pIN-III-ompA-2. Con este sistema, AM55 se acumula mayoritariamente en el sobrenadante celular. Sin embargo, la proteína no se expresaba en medio de cultivo mínimo debido a que el sistema de excreción *ompA* queda

reprimido en estos medios. Se ha aprovechado la toxicidad de AM55 cuando se acumula en el medio intracelular, para seleccionar cepas derivadas de *E. coli* BL21 que tuvieran constitutivamente activo el sistema de excreción. Estas cepas supersecretoras, que hemos denominado BL21-SS, son capaces de crecer en un medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono y han resultaron ser incluso más eficientes que las que crecen en medios ricos. Con estas cepas, crecidas en cloruro amónico marcado con ^{15}N , hemos obtenido AM55 etiquetada con ^{15}N como producto de secreción en el medio de cultivo, a partir del cual se ha purificado a homogeneidad mediante dos etapas de fraccionamiento por precipitación, con calor y etanol, una cromatografía de intercambio iónico y otra de intercambio catiónico, con un rendimiento final de 20 mg por litro de cultivo.

La proteína recombinante se ha caracterizado molecular y estructuralmente demostrando su equivalencia total con la proteína natural. Esta proteína recombinante, marcada con ^{15}N y altamente homogénea, se utilizó para la determinación de su estructura tridimensional a una resolución que no se había conseguido hasta ahora en que hubo que utilizar proteína sin marcar y con la heterogeneidad típica de los productos naturales. Esta determinación de la estructura tridimensional (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003) no forma parte de esta tesis.

CONCLUSIONES

- 1- El componente proteico del principio activo AM5 de la especialidad Inmunoferon[®] está constituido por tres polipéptidos de 12.3, 11.4 y 7.3 kDa, que denominamos AM55, AM56 y AM57, respectivamente. AM55 y AM56 son heterodímeros que constan de dos subunidades de distinto tamaño unidas por puentes disulfuro. AM 57 está formado por una única cadena polipeptídica.
- 2- AM55 y AM56 han sido identificados como las proteínas de reserva del ricino de la familia de las albuminas 2S, Ric c3 y Ric c1, respectivamente, y AM57 como la cadena pesada de AM56.

- 3- Se ha detectado heterogeneidad en las fracciones de AM55 y AM56, en el análisis por espectrometría de masas. Esta heterogeneidad es debida al procesamiento inespecífico del polipéptido precursor común.
- 4- La estructura secundaria de AM55 y AM56 es virtualmente idéntica y consiste en: 59-62% de hélice α , 3% de lámina β , 12-11% de giros β y 26-27% de estructura desordenada. La estructura secundaria de las subunidades que conforman AM55 y AM56 carece de elementos estructurales tipo nativo. Sugiriendo que los puentes disulfuro son esenciales para mantener la estructura nativa de estas proteínas.
- 5- AM55 y AM56 son proteínas estables frente a la desnaturalización inducida por agentes químicos, temperatura y pH. Su estructura nativa prácticamente no se altera en presencia de urea 8 M o GnCl 4 M; cuando el pH se baja a 2, o se sube a 9; o cuando la temperatura se incrementa hasta 90°C. La desnaturalización completa, aunque reversible, únicamente se consigue con GnCl 8 M. También son resistentes a la hidrólisis con pepsina, tripsina o quimotripsina. Sugieren que son capaces de atravesar el tubo digestivo sin sufrir alteraciones significativas en su estructura nativa
- 6- La expresión intracelular de AM55 conlleva toxicidad para *E. coli*. Se ha conseguido sobre-expresar AM55 en medio rico utilizando sistemas de expresión periplasmática basados en vectores de la serie pIN-III, así como cepas de *E.coli* BL21. Sin embargo, la expresión en medio mínimo con este sistema no fue posible debido a la represión del sistema de excreción.
- 7- Se ha aislado la nueva cepa supersecretora BL21-SS capaz de crecer en medio mínimo, con una única fuente de nitrógeno y de carbono, y simultáneamente sobreproducir proteína recombinante y secretarla al medio de cultivo. Con esta cepa se ha producido la proteína AM55 etiquetada con ^{15}N . La proteína se ha purificado a partir del medio extracelular con un alto rendimiento (25 mg de rAM55 purificada por litro de cultivo celular). La obtención de la proteína etiquetada ha hecho posible la resolución de su estructura tridimensional por RMN con una resolución que no se había conseguido en estudios precedentes.

LISTA DE ABREVIATURAS

aFGF: factor de crecimiento para fibroblastos ácido

APC: célula presentadora de antígeno

BCG: bacilo de Calmette y Guérin

BCR: receptor de células B

BSA: albúmina de suero bovino

CD: difracción circular

CSF: factor estimulante de colonias

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: mezcla equimolar de los cuatro desoxirribonucleótidos

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Fc: fracción constante de Ig

FDA: Food and Drug Administration

G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos

GM-CSF: factor de crecimiento de colonias granulocito macrófago

GnCl: cloruro de guanidinio

IFC: Industrial Farmacéutica Cantabria

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

LPS: lipopolisacárido

LTPs: proteínas transferidoras de lípidos

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fly*

MBR: modificadores de la respuesta biológica

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: tampón fosfato salino

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones

PTH: feniltiohidantoina

PVDF: fluoruro de polivinilideno

RMN: resonancia magnética nuclear

RNAasa: ribonucleasa

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

TAE: tampón Tri-acetato

TBS: tampón Tris salino

TFA: ácido trifluoroacético

Th: células T colaboradoras

Th1: células T helper clase 1

Th2: células T helper clase 2

TLR: *toll-like receptors*

TNF: factor de necrosis tumoral

UV: luz ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del sistema inmune

El término inmunidad se emplea para designar al conjunto de mecanismos de defensa que le permiten a un organismo protegerse de los microorganismos que encuentra en su medio ambiente, evitar el desarrollo de células tumorales y eliminar moléculas nocivas originadas en su interior como consecuencia del envejecimiento, infecciones, traumatismo o crecimiento neoplásico. El sistema inmunitario está formado por las células y las moléculas que son responsables de dicha inmunidad, mientras que la respuesta coordinada y colectiva de los componentes del sistema inmunitario frente a sustancias extrañas constituye la respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria se inicia siempre con el reconocimiento del patógeno o del material extraño y su finalidad es desarrollar un mecanismo que conduzca a su anulación funcional o a su destrucción (Abbas *et al.*, 2004).

La respuesta inmunitaria consta de dos componentes bien diferenciados pero que trabajan sinérgicamente: la inmunidad innata (también conocida como natural o inespecífica) y la inmunidad adaptativa (también conocida como adquirida o específica). La respuesta adaptativa se basa en la selección clonal de linfocitos antígeno específicos que, a largo plazo, originan una protección duradera y específica. Por el contrario, la respuesta inmune innata no es específica del patógeno invasor y no genera memoria inmunológica. Ordinariamente, la respuesta inmune innata precede a la adaptativa, activando y determinando la naturaleza de esta última y cooperando en el mantenimiento de la homeostasis (Fearon & Locksley, 1996).

Funcionalmente, la respuesta inmune consta de tres pasos secuenciales: el reconocimiento de manera inespecífica y específica del agente extraño por parte de fagocitos, linfocitos T y B y otros tipos celulares; la regulación a través de la interacción de los distintos elementos del sistema inmunitario para que se activen y regulen, y la respuesta del tipo e intensidad adecuada para la eliminación o inactivación del agente extraño.

1.1.1. Inmunidad innata o no específica

La característica esencial de la inmunidad innata es su capacidad para provocar una respuesta rápida contra el microorganismo patógeno sin necesidad de inducción o maduración de linfocitos, por lo que constituye la primera línea de defensa frente a los agentes patógenos (Medzhitov & Janeway, 2000). Los principales componentes de este tipo de respuesta son las barreras físicas y químicas, constituidas por la piel y mucosas, y las sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; proteínas plasmáticas entre las que se incluyen el sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; las células fagocíticas, principalmente macrófagos, neutrófilos y células dendríticas; y otros leucocitos como las células NK, los linfocitos $T\gamma\delta$ y los linfocitos B1 productores de anticuerpos “naturales” (Martin & Kearny., 2001). Estos anticuerpos reconocen estructuras altamente conservadas y están implicados en la remoción de células envejecidas y apoptóticas, y en mecanismos de inmunomodulación (Coutinho *et al.*, 1995).

Las células del sistema inmune innato realizan dos tipos de actividades de defensa de forma inespecífica: la fagocitosis y las reacciones de citotoxicidad. Las células fagocíticas internalizan y destruyen a los agentes patógenos o partículas extrañas y, al mismo tiempo, coordinan respuestas adicionales mediante la liberación de mediadores inflamatorios y citoquinas como el TNF- α y la IL-1 que activan de manera complementaria la inmunidad adquirida. En el macrófago, célula presentadora de antígeno, el patógeno es degradado y los fragmentos que resultan se presentan a los linfocitos T para iniciar la activación de la respuesta inmune adaptativa y el establecimiento de una inmunidad a largo plazo creando una intersección entre los dos tipos de inmunidad. Desde un punto de vista filogenético, la inmunidad innata es mucho más antigua que la adaptativa.

El fundamento de la respuesta inmune innata reside en la capacidad de reconocer sustratos identificables dentro de una amplia gama de microorganismos diferentes pero que no se encuentran presentes en el huésped. Esto es posible gracias a la existencia de receptores no clonales que reconocen fragmentos de los microorganismos patógenos que han sido seleccionados evolutivamente de manera que unos pocos receptores innatos detecten el amplio rango de la diversidad microbiana (Medzhitov & Janeway,

2000). Esta estrategia se conoce como “reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos” (pathogen associated molecular patterns; PAMPs). El reconocimiento de los PAMPs está mediado por receptores también muy conservados en la evolución y que son conocidos como “receptores de reconocimiento de patrones” (pattern recognition receptors; PRRs) (Lebedev & Pomyakina 2006). Los PAMPs incluyen componentes de la pared celular de bacterias como el lipopolisacárido (LPS), los peptidoglicanos o los ácidos teicoicos y otros componentes de hongos, levaduras y protozoos. Estas moléculas pueden ser vistas como firmas moleculares de los agentes invasores. Existen dos tipos fundamentales de PRR, los que median los mecanismos de fagocitosis y los que inducen vías de activación de mediadores pro-inflamatorios. Las primeras investigaciones sobre estos receptores se realizaron en la mosca *Drosophila melanogaster* (Lemaitre *et al.*, 1996), que carece de inmunidad adquirida, y ha dado lugar al descubrimiento de toda una familia de estos receptores de membrana denominados “toll-like receptors” (TLR) (Muzio & Mantovani, 2000). En 1997, Medzhitov *et al.*, descubrieron el primer receptor “toll” en humanos, denominado TLR4. Hasta el momento, se han descrito en mamíferos 15 receptores tipo Toll, de los cuales 10 son los más frecuentes en humanos. Cada uno reconoce un PAMP específico. La estimulación de estos receptores inicia una cascada intracelular de quinasas que produce una translocación de factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo. El factor de transcripción más importante que se activa es el NF- κ B que estimula la producción de gran número de citoquinas, quimioquinas, péptidos antimicrobianos y aumenta la expresión de moléculas de adhesión y coestimuladoras que participan en la respuesta innata adaptativa.

Los TLRs se encuentran principalmente en la membrana de macrófagos, monocitos y neutrófilos, dotándoles así de la capacidad para reconocer a los patógenos rápida y directamente en el sitio de la infección.

1.1.2. Inmunidad adaptativa o específica

Las características distintivas de la inmunidad adaptativa son su extraordinaria especificidad antigénica y su capacidad para generar memoria inmunológica y responder con mayor intensidad tras exposiciones repetidas al mismo patógeno. Los componentes celulares responsables del reconocimiento específico de los agentes

extraños para el organismo y el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa son los linfocitos B y T (Abbas *et al.*, 2004).

Los linfocitos B y T se originan en la médula ósea. Los linfocitos B maduran en la propia médula ósea y posteriormente en el bazo mientras que los linfocitos T maduran en el timo. Una vez concluida la maduración en los órganos linfáticos primarios los linfocitos B y T vírgenes, es decir, aquellos que aún no han entrado en contacto con un antígeno, circulan continuamente desde la sangre hacia los tejidos linfoides secundarios. En presencia de un agente infeccioso, los linfocitos que reconocen el antígeno específico quedan retenidos en el tejido linfático secundario donde se activan mediante un delicado proceso bioquímico, proliferan y se diferencian en células efectoras (Delves & Roitt., 2000). Luego estas células efectoras migrarán hacia las zonas de inflamación para eliminar al agente infeccioso. Según el tipo de antígeno y el microambiente, el sistema inmune desencadenará una respuesta adaptativa de tipo humoral o celular.

La respuesta de tipo humoral está mediada por los linfocitos B y es el principal mecanismo de defensa frente a los patógenos extracelulares y sus toxinas. Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Cada célula B madura expresa en su membrana un receptor antígeno-específico denominado BCR (B cell receptor). El receptor de un linfocito B (BCR) es un complejo glicoprotéico transmembrana que incluye una inmunoglobulina (Ig) de membrana propia de cada linfocito y responsable del reconocimiento específico del antígeno (Matsuuchi & Gold., 2001). Cuando tiene lugar la exposición a un antígeno extraño, sólo aquellos linfocitos cuyo BCR es capaz de reconocer un epítipo antigénico, serán activados y expandidos para diferenciarse en linfocitos B de memoria o en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Las células plasmáticas producen generalmente sólo un tipo de anticuerpo y éste siempre corresponde a la forma secretada o soluble de la Ig de membrana del linfocito B del cual deriva la célula plasmática. La forma de membrana de una Ig es un componente estructural y funcional del receptor BCR; su forma soluble o secretada constituye en cambio un anticuerpo, que conserva la especificidad por el antígeno y es además responsable de la función efectora de la respuesta inmune humoral: neutralización del antígeno, reclutamiento y activación de fagocitos, activación del

sistema del complemento, reclutamiento y activación de células NK, macrófagos y otras células capaces de realizar citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

La inmunidad celular, también llamada inmunidad mediada por células, corre a cargo de los linfocitos T. Los microorganismos intracelulares, como los virus y bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tiene acceso los anticuerpos circulantes producidos por los linfocitos B. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular, que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas.

Los linfocitos T poseen receptores de membrana denominados TCR (T cell receptor) que, al contrario de las Ig de membrana de las células B, capaces de reconocer antígenos aislados, sólo reconocen péptidos antigénicos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Para que dicho reconocimiento tenga lugar se requiere la participación de las células presentadoras de antígeno profesionales (APC; células de Langerhans, macrófagos, células B o células dendríticas). Estas células captan y procesan antígenos pertenecientes a agentes infecciosos convirtiéndolos en pequeños fragmentos peptídicos. Estos se asocian a glicoproteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y/o II (MHC) formando un complejo que se sitúa en la superficie de la célula presentadora de antígeno, pudiendo entonces ser reconocido por los linfocitos T (Barber & Parham 1993). Así, la presentación antigénica en el contexto de una molécula MHC y el reconocimiento del complejo molécula MHC-péptido por el receptor T, proporciona al sistema inmune un mecanismo de control o detección de proteínas anormales en células transformadas o tumorales y de proteínas extrañas en células infectadas por virus, bacterias o parásitos.

Existen dos poblaciones de células T bien definidas con funciones distintas: una subpoblación posee el marcador proteico de membrana CD4, son las células T colaboradoras (Th), mientras que la otra subpoblación posee el marcador CD8, son las células T citotóxicas (Tc) que destruyen células infectadas. Los linfocitos T CD4+ desempeñan un rol muy importante en la inmunidad protectora contra bacterias y protozoos, mientras que los linfocitos T CD8+ resultan fundamentales en la respuesta inmune contra infecciones virales. Los linfocitos T cooperadores tras activarse y

diferenciarse se dividen en dos subpoblaciones en función de las citoquinas que producen: Th1 y Th2 (Mosmann y Coffman, 1989). Los linfocitos Th1 se caracterizan por sintetizar IL-2, IFN- γ e IL-3 y estimulan la respuesta inmune celular mientras que los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y promueven la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B.

1.2. Inmunomodulación

Los mecanismos defensivos que acabamos de describir actúan coordinadamente, las células implicadas se comunican mediante citoquinas, que establecen una serie de redes de comunicación complejas, y el sistema inmune funciona como un todo integrado. Así, por ejemplo, los macrófagos estimulados por productos microbianos (PAMPs) producen citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas IL-1 que, a su vez, coadyuva a la activación de linfocitos T, e IL-6, que promueve la diferenciación de las células B activadas a células plasmáticas. Por su parte, las células Th1 activadas producen IFN- α que activa a los macrófagos, los cuales producirán todo su arsenal de citoquinas. En cambio, las células Th2 producen IL-10, que inhibe a las Th1 y a los macrófagos. Resulta evidente que la complejidad de este sistema requiere la participación de complicados mecanismos de control encargados de evitar que se produzcan alteraciones y fallos en la naturaleza, intensidad y duración de la respuesta inmunitaria, que puedan desencadenar el desarrollo de diversos tipos de patologías.

De lo antedicho se deduce que la respuesta inmune constituye una secuencia muy compleja e intrincadamente regulada de procesos que involucra varios tipos celulares y multitud de mediadores moleculares inmunitarios. Cuando las diferentes fases de esta respuesta, que incluyen el procesamiento antigénico, la inducción de las células reguladoras y la generación de las efectoras, son eficientes, se consigue la eliminación del agente agresor. Sin embargo, en ocasiones esta respuesta es insuficiente, o por el contrario, presenta una actividad exagerada, dando lugar a patologías diversas. La respuesta inmune deficiente generalmente conlleva el desarrollo de procesos infecciosos pero también tumorales. El proceso infeccioso, a su vez, desencadena la respuesta inflamatoria en el tejido afectado (Kim & Deutschman., 2000)

que, de no restablecerse la respuesta inmune normal, se vuelve más sensible a la posible colonización por nuevos agentes infecciosos.

La respuesta inmune deficiente frente a la infección también puede provocar la pérdida de control en la regulación de la función linfocitaria con la consiguiente modificación en la secreción de citoquinas y quimioquinas que inducen alteraciones y daño tisular a distancia de la zona en la que se inició la respuesta inmune (Kim & Deutschman., 2000).

Por otra parte, la respuesta inmune excesiva y/o por “diana equivocada” da lugar a diversas patologías derivadas de la inducción de una respuesta inadecuada a lo propio, como sucede en las enfermedades inflamatorias autoinmunes (Davidson & Diamond., 2011), o frente a antígenos externos, alérgenos, en el caso de las alérgicas (Kay., 2001), o frente a la aceptación de un órgano o células no totalmente compatibles, en los trasplantes.

Todos estos procesos generan una regulación inadecuada de la respuesta inmune y de la distribución tisular de sus células reguladoras y efectoras que provoca inflamación en los tejidos afectados. La modulación de las funciones efectoras y reguladoras del sistema inmune con el objetivo de restaurar el correcto funcionamiento para evitar o prevenir el desarrollo de las patologías derivadas de una respuesta inmune incorrecta se denomina inmunomodulación. Esto se consigue mediante el empleo de agentes inmunomoduladores, también llamados modificadores de la respuesta biológica (MBR), sustancias capaces de modular algún mecanismo inmunológico, ya sea normalizando aquellos parámetros que se encuentren incrementados o sean excesivos o aumentando los que se encuentren defectuosos, con el menor efecto negativo posible. Como ejemplos extremos de inmunomodulación podemos mencionar a la vacunación para evitar infecciones, provocando una respuesta inmunológica de memoria capaz de eliminar, en un encuentro posterior, el agente infeccioso contra el que se ha vacunado; o, el tratamiento con inmunosupresores para evitar el rechazo de un órgano trasplantado.

Desde el punto de vista terapéutico, los inmunomoduladores tienen un potencial muy amplio como terapia adyuvante en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, alérgica, autoinmunidad e inmunodeficiencias. Además, suponen nuevas alternativas de

tratamiento en enfermedades que tradicionalmente contaban con pocas opciones terapéuticas. Por otra parte, es conveniente destacar que, el creciente problema de la resistencia a los agentes antibióticos y quimioterapéuticos en las enfermedades infecciosas, hace aún más patente el impacto benéfico que puede tener la modulación de la respuesta inmune en la resolución de la infección.

1.2.1. Tipos de inmunomoduladores

Los inmunomoduladores o modificadores de la respuesta biológica (MBR) forman un grupo de sustancias de naturaleza muy variada que tienen en común la capacidad de modular la respuesta inmune, estimulándola o suprimiéndola. Estos agentes incluyen sustancias sintéticas, recombinantes y de origen natural.

El conocimiento creciente en relación a los mecanismos de funcionamiento y regulación del sistema inmunológico junto al gran desarrollo experimentado por la biotecnología, en especial la tecnología de hibridomas y recombinación de ADN para producir grandes cantidades de anticuerpos, proteínas y péptidos, han hecho posible que en la actualidad dispongamos de un gran número de agentes inmunomoduladores (Patil *et al.*, 2012). No obstante, conviene señalar que pese a los enormes avances realizados en la obtención de inmunomoduladores selectivos y específicos, la principal limitación de su aplicación clínica reside en la complejidad de la respuesta inmune, que hace muy difícil modular un componente aislado de esta compleja red sin perturbar la homeostasis de todo el sistema.

Desde una perspectiva clínica podemos diferenciar cinco grupos de inmunomoduladores: citoquinas, anticuerpos monoclonales, análogos de receptores solubles, inmunomoduladores sintéticos e inmunomoduladores de origen natural.

1.2.1.1. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular (15-25 kDa), generalmente glicosiladas, secretadas por las células del sistema inmune (macrófagos y linfocitos T, fundamentalmente) en respuesta a patógenos, a sus productos u otras señales relacionadas y que actúan a unas concentraciones muy bajas sobre células del propio sistema inmune, de forma autocrina o paracrina (Hamblin, 1993). Su función es reguladora siendo fundamentales en la comunicación y en las interacciones que

establecen las células del sistema inmune entre sí y con otras células. Dirigen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune específica e intervienen en la regulación de la inflamación y en la hematopoyesis, por lo que representan una solución terapéutica importante en el tratamiento de muchas enfermedades inmunitarias e inflamatorias.

Entre las citoquinas utilizadas como inmunoreguladores se incluyen: interleuquinas, interferones, factor de necrosis tumoral y factores estimulantes de colonias.

1.2.1.1.1. Interleuquinas

Se denominan interleuquinas a las citoquinas producidas por linfocitos. La interleuquina más utilizada como inmunomodulador es la interleuquina 2. Esta citoquina producida por linfocitos T, facilita y permite la expansión clonal de estas células. Además, estimula la producción de células NK y de linfocitos B. La IL-2 se utiliza en el tratamiento del carcinoma de células renales (McDermott., 2009) y el melanoma metastásico (Antony & Dudek., 2010) y, asociada con terapia antirretroviral específica, en ciertos casos de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Parienti, 2002).

1.2.1.1.2. Interferones

Este apartado incluye a los interferones alfa, beta y gamma. El IFN- α (producido por fagocitos) está estructuralmente relacionado con el IFN- β (producido por fibroblastos) y ambos son secretados en respuesta a la estimulación con virus y polirribonucleótidos. En cambio, el IFN- γ no está relacionado estructuralmente con ellos, y es producido por células Th1 activadas y células NK en respuesta a estímulos específicos, mitógenos e IL-2. Además, tiene importantes propiedades inmunomoduladoras que no poseen los otros interferones (Schroder *et al.*, 2004).

El interferón alfa posee tanto efectos inmunomoduladores como antivirales, y su aplicación más extendida es la de su empleo en las hepatitis crónicas por virus B y virus C (García Buey *et al.*, 2008). También se aplica en varias enfermedades tumorales, como la leucemia mieloide crónica (Kujawski & Talpaz., 2007), la tricoleucemia, el melanoma y el carcinoma de células renales (McDermott., 2009). El

interferón beta, por el contrario, se utiliza en el control de la respuesta inmune en la esclerosis múltiple. Por último, el interferón gamma tiene efectos reguladores sobre las células fagocíticas y presentadoras de antígenos (Platanias, 2005), empleándose en pacientes con deficiencias en estas funciones y en infecciones intracelulares del sistema reticuloendotelial.

1.2.1.1.3. Factores estimulantes de colonias

Los factores estimulantes de colonias (CSF) actúan sobre las células madre de la médula ósea, progenitoras de los linajes mieloide/monocitoide, promoviendo su diferenciación en neutrófilos (granulocitos) (G-CSF), o en neutrófilos, monocitos y células dendríticas (GM-CSF) (Clark & Kamen., 1987).

Los fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer y otras patologías pueden dañar esta capacidad productora de la médula, por lo que los pacientes que los reciben tienen mayor riesgo de contraer infecciones, desarrollar anemia o sufrir sangrados. La estimulación del sistema inmune con estos CSF beneficia claramente a estos pacientes, utilizándolos tanto para prevenir como para tratar los efectos mencionados, permitiendo, además, la utilización de dosis mayores de fármacos sin aumentar el riesgo de infección o la necesidad de transfusión, al combinarlos con los esquemas de quimioterapia más agresivos.

Dentro de este grupo, los dos CSF con mayor aplicación clínica son el factor de crecimiento de colonias granulocito macrófago (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Estas citoquinas se emplean habitualmente como estimuladores de la producción leucocitaria después del trasplante de médula ósea y en la recuperación de la médula tras la quimioterapia oncológica (Morstyn, 1990), así como en algunas neutropenias congénitas y fases de neutropenia derivadas de infecciones grave.

1.2.1.2. Anticuerpos monoclonales

La disponibilidad de procedimientos biotecnológicos que permiten producir cantidades ilimitadas de anticuerpos monoclonales, es decir, con una sola especificidad, ha facilitado la aplicación clínica de estas moléculas con fines terapéuticos. La extraordinaria capacidad de reconocimiento de fragmentos moleculares por el sistema

inmunitario permite la generación de una enorme diversidad de anticuerpos dirigidos contra cualquier molécula diana que pueda estar implicada en patología humana.

Los anticuerpos monoclonales se utilizan como agentes terapéuticos principalmente en el tratamiento del rechazo agudo de alotrasplantes, en enfermedades autoinmunes, como agentes anti tumorales y en el tratamiento de ciertas enfermedades inflamatorias crónicas. Como ejemplo en el tratamiento del rechazo de aloinjertos podemos citar al anticuerpo monoclonal anti CD3, específico para el antígeno CD3 de la superficie de linfocito T al que se une, estimulando así la activación del complemento que a su vez destruye el linfocito T (Loertscher, 2002). Este anticuerpo también se aplica en enfermedades autoinmunes (Chatenoud & Waldmann., 2012; Daifotis, 2013). Los anticuerpos monoclonales anti CD20, por el contrario, eliminan selectivamente células B, y se emplean en el tratamiento de linfomas y en enfermedades autoinmunes (Lim *et al.*, 2010). En el tratamiento de estas enfermedades también se usan anticuerpos anti CD4 que actúan inhibiendo la función de los linfocitos cooperadores (Isaacs *et al.*, 1997). Los anticuerpos monoclonales también se emplean para bloquear moléculas propias o extrañas que pueden provocar daño en el organismo. Un ejemplo de esta aplicación lo constituyen los anticuerpos monoclonales anti-factor de necrosis tumoral. El fundamento de su aplicación clínica se basa principalmente en bloquear la acción proinflamatoria del TNF, implicada en la fisiopatología de diferentes enfermedades inflamatorias del sistema inmunitario. Se utilizan en el tratamiento de la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn. También se emplean anticuerpos monoclonales frente a antígenos tumorales, intentando incrementar la capacidad efectora del sistema inmune.

1.2.1.3. Análogos de receptores solubles

El fundamento terapéutico de esta estrategia consiste en el bloqueo de moléculas a través de sus ligandos naturales de la superficie celular, administrados en forma soluble. Inicialmente el principal problema que planteaba el uso de los receptores solubles era su limitada vida media. Sin embargo, su fusión con la fracción constante (Fc) de la IgG1 humana resolvió este inconveniente, confiriéndole un perfil farmacocinético apropiado para su empleo en patología humana.

El único producto de esta familia aprobado por ahora es el receptor soluble del TNF. Se trata de una proteína de fusión constituida por la cadena p75 del receptor del TNF y el fragmento Fc de la IgG1. Su acción biológica y utilidad terapéutica son similares al anticuerpo monoclonal frente al TNF. Está indicado en el tratamiento de la artritis reumatoide (Garrison & McDonnell., 1999) y psoriásica (Mease, 2002).

1.2.1.4. Inmunomoduladores naturales

Este grupo heterogéneo incluye un conjunto de sustancias que tienen en común su procedencia de una fuente natural y su carácter multiespecífico. Dentro de los inmunomoduladores naturales constituye un importante grupo aquellos diseñados con el objetivo de estimular mecanismos de inmunidad natural, en particular la actividad NK o las actividades fagocitarias y microbicidas del sistema mononuclear fagocítico. Entre ellos se puede mencionar extractos bacterianos, bacilo de Calmette y Guérin (BCG), extractos de *Polypodium leucotomos*, derivados del muramildipéptido, así como polisacáridos, especialmente glucanos extraídos de levaduras. Formando parte de este grupo se encuentra también el fármaco español Inmunoferon[®].

1.2.1.4.1. Bacilo de Calmette y Guérin (BCG)

El bacilo de Calmette y Guérin o BCG es una forma no patógeno, pero sí inmunógena, derivada de una cepa de *Micobacterium bovis*. Inicialmente se empleó como vacuna contra la tuberculosis. Fue la primera terapia biológica aprobada por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) y es uno de los moduladores de la respuesta biológica con más años de estudio y aplicación clínica.

En la actualidad, BCG se utiliza en la prevención de la recurrencia del carcinoma superficial de vejiga (Meyer *et al.*, 2002, O'Donnell, 2009). Este fármaco induce la respuesta inmune tras su interacción física con el epitelio vesical, provocando una reacción local inflamatoria y la infiltración de la pared por células inmunocompetentes activadas, lo que conduce a la destrucción de las células neoplásicas. Se ha podido comprobar que, aproximadamente, el 70% de los pacientes con cáncer de vejiga en estado inicial experimentan una remisión después de la terapia con BCG (Smith *et al.*, 2008). Otras posibles aplicaciones del BCG son el tratamiento del cáncer de colon (Mosolits *et al.*, 2005) y el melanoma (Stewart & Levine., 2011)

1.2.1.4.2. Polypodium leucotomos

Extractos de este helecho se han utilizado como antivírico debido a su capacidad para favorecer la expansión de los linfocitos citotóxicos. También tiene aplicación en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en procesos inflamatorios. En este caso su acción parece deberse a la inhibición de la liberación de citoquinas activadoras de linfocitos del subtipo CD4+ Th1 en favor de aquellas activadoras de la acción de los linfocitos CD4+ Th2 y supresoras de la actividad de los Th1, ya que, tanto en las enfermedades autoinmunes como la inflamación, la actividad de los linfocitos del subtipo Th1 está anómalamente aumentada (González *et al.*, 2000).

1.3. Inmunoferon®

1.3.1. Definición

AM3 (glicofosfopeptical) es un modificador de la respuesta biológica desarrollado por Industrial Farmacéutica Cantabria (IFC), S. A., y comercializado desde 1981 bajo la marca registrada Inmunoferon®. Este producto ha sido químicamente definido como una asociación no covalente polisacárido/proteína que representa aproximadamente un 2% en peso, absorbida sobre una matriz estabilizante de sulfato y fosfato cálcicos. El polisacárido es un glucomanano de ~ 150 kDa aislado de la pared celular de una cepa de *Candida utilis*, mientras que el componente proteico se obtiene de semillas no germinadas de ricino (*Ricinus communis*). Según la información suministrada por IFC, dicha asociación se prepara a partir de la combinación de extractos secos de las semillas y de las levaduras obtenidos tras un proceso fermentativo extractivo espontáneo y controlado en un medio específico seguido de una lisis químico-enzimática controlada y de un proceso de concentración y ulterior purificación por adsorción o diálisis exhaustiva y secado.

1.3.2. Propiedades inmunomoduladoras

Desde el punto de vista farmacológico AM3 ha demostrado tener, tanto en modelos experimentales como en humanos, una amplia actividad biológica siendo sus principales dianas las células accesorias y fagocíticas, las células NK y los linfocitos T.

Se han descrito seis efectos inmunomoduladores asociados a la actividad de AM3:

- 1) Estimulación de las actividades fagocitarias y microbidas del sistema mononuclear fagocítico (Cañavete *et al.*, 1984; Gillissen & Breuer-Werle., 1984; Larrad *et al.*, 1985; Barasoain *et al.*, 1989).
- 2) Estimulación de la acción citotóxica de macrófagos y células NK (Rojo *et al.*, 1986; Villarrubia *et al.*, 1987; Villarrubia *et al.*, 1997).
- 3) Incremento de la proliferación y activación de linfocitos T (Rojo *et al.*, 1986).
- 4) Capacidad para incrementar los mecanismos de renovación hematopoyética y promover los fenómenos de distribución celular tisular (Real *et al.*, 1992; Güenechea *et al.*, 1995).
- 5) Inhibición parcial en la producción endógena del factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Brieva *et al.*, 2002).
- 6) Modulación de la síntesis endógena de citoquinas reguladoras (IL-1 (Barasoain *et al.*, 1989), IL-2 (Rojo *et al.*, 1986), IL-12 (Villarrubia *et al.*, 1996), IFN- γ (Moya *et al.*, 1987), CM-CSF (Güenechea *et al.*, 1995)).

En conjunto, estos efectos explican el mecanismo de acción del fármaco consistente en la generación de una respuesta de mediación celular que incluye la participación coordinada de mecanismos inmunológicos naturales y específicos.

1.3.3. Aplicaciones terapéuticas

AM3 se ha empleado en el tratamiento de enfermedades muy diversas, caracterizadas por un estado inflamatorio y/o infeccioso crónico, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la hepatitis B crónica, la estomatitis aftosa recurrente, las infecciones crónicas recidivantes del tracto respiratorio superior, la insuficiencia renal en hemodiálisis y la inflamación muscular.

1.3.3.1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

La EPOC es la principal causa neumológica de morbilidad en el mundo. En España la padece un 9% de los individuos mayores de 40 años y un 20% de los mayores de 65 años (Sobradillo *et al.*, 2000). Se ha comprobado que se asocia a diversas alteraciones en la inmunidad natural y adquirida que pueden relacionarse con el mantenimiento del estado inflamatorio y con la predisposición a contraer infecciones víricas y bacterianas en el tracto respiratorio (Ssaetta *et al.*, 1999; Cosio *et al.*, 2002). Aunque los mecanismos celulares y moleculares implicados en esta predisposición al desarrollo de infecciones no se conocen con exactitud, existen resultados que indican la relación de las alteraciones funcionales de los linfocitos T y NK y de las células fagocíticas en su patogenia (Prieto *et al.*, 2001).

Diversos estudios han demostrado la eficacia de AM3, tanto en la recuperación y normalización de la deficiente actividad fagocítica de células polimorfonucleares y macrófagos de pacientes con EPOC, como en la mejoría de la actividad citotóxica y citolítica de los linfocitos citolíticos naturales (Prieto *et al.*, 2001). También se ha demostrado la capacidad del fármaco para restaurar las alteraciones que se observan en el compartimiento de linfocitos T de estos pacientes (Reyes *et al.*, 2006). Es posible que los efectos inmunomoduladores de AM3 sobre los linfocitos T puedan adyudar en la respuesta a las infecciones víricas. Por otra parte, el efecto antiinflamatorio de AM3, mediado a través de la inhibición de la producción de TNF- α y la inducción de sus receptores solubles (Brieva *et al.*, 2002), pudiera estar implicado en una disminución de la reacción inflamatoria de la mucosa respiratoria que caracteriza a estos pacientes.

Estos efectos y mecanismos de acción de Inmunoforon[®] explican el resultado clínico obtenido en los enfermos que padecen EPOC: disminución en el número de episodios infecciosos agudos recidivantes del tracto respiratorio y su duración, y disminución del tiempo de tratamiento antibiótico (Alvarez-Mon *et al.*, 2005).

1.3.3.2. Estomatitis aftosa recidivante

En esta patología de origen desconocido pero de probable causa viral los estudios realizados con Inmunoforon[®] han demostrado que el fármaco induce una disminución significativa del número y duración de las úlceras que se correlaciona

con un incremento numérico de células NK de sangre periférica (Lacosta & Martínez., 1998).

1.3.3.3. Tuberculosis

La eclosión de la tuberculosis asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) junto con la aparición de resistencias micobacterianas a los agentes tuberculostáticos, han hecho reconsiderar la utilización de inmunomoduladores capaces de aumentar los mecanismos de inmunidad de mediación celular.

Como ya comentamos en el apartado 1.2, la eliminación de micobacterias así como la lucha frente a patógenos intracelulares depende del estado de reactividad de los mecanismos de inmunidad celular, en los cuales el interferón gamma juega un papel primordial.

La capacidad de Inmunoferon[®] para inducir la producción de interferón gamma e interleuquina 12 llevó a la realización de diferentes estudios clínicos que demostraron que el tratamiento con el fármaco asociado a la clásica quimioterapia antituberculosa disminuía el tiempo necesario para la negativización bacteriológica del esputo, aceleraba la curación de las lesiones y mejoraba la sintomatología clínica relacionada con la enfermedad (Camerota *et al.*, 1984). Además, los parámetros de funcionalidad hepática (transaminasas y bilirrubina), previamente alterados o alterados como consecuencia de la quimioterapia antituberculosa se normalizaban tras el tratamiento con Inmunoferon[®].

1.3.3.4. Hepatitis B crónica

AM3 también se ha utilizado en el tratamiento de infecciones virales como la hepatitis B. Los pacientes con hepatitis B crónica presentan alteraciones en la reactividad de las células NK, en parte provocadas por la acción directa del virus de la hepatitis B sobre estas células. La reconocida capacidad de Inmunoferon[®] para potenciar los mecanismos de inmunidad natural, concretamente de células NK, ha dado lugar a la realización de estudios en esta patología. En un trabajo realizado en pacientes con infección crónica por el virus B de la hepatitis se comprobó que la administración terapéutica de AM3 durante 12 meses indujo una respuesta completa del 61% con

negativización del DNA viral, negativización del antígeno e inducción de anticuerpos antígeno e (Pérez-García *et al.*, 2002).

1.3.3.5. Adyuvante

Como ejemplo de adyuvante a vacunas de AM3 se puede destacar su empleo con la vacuna del virus B, tanto en pacientes sanos que no responden adecuadamente a la vacunación como en pacientes que sufren algún tipo de alteración inmunológica, como sucede en los pacientes con insuficiencia renal crónica sujetos a hemodiálisis periódica. Estos enfermos representan una población con marcadas alteraciones funcionales del sistema inmune que generan alto riesgo de padecer infecciones, incluyendo las relacionadas con los hemoderivados, como la hepatitis por virus B, que causa elevada mortalidad. La inmunodeficiencia en estos pacientes explica la baja eficacia de la vacuna del virus B en la inducción de una respuesta protectora en el paciente. Para intentar incrementar la respuesta inmune a la vacuna del virus B se han utilizado diferentes adyuvantes, entre los que se incluyen citoquinas como el interferón alfa y gamma, la interleuquina 2 y el GM-CSF. La demostrada habilidad de Inmunoferon[®] para inducir la secreción de estas citoquinas ha llevado a su aplicación con éxito como adyuvante en la vacunación frente a la hepatitis B de individuos sanos y pacientes con uremia crónica que habían sido no respondedores a la vacunación (Perez-Garcia *et al.*, 2002).

Estas aplicaciones muestran las amplias potencialidades terapéuticas de Inmunoferon[®] en diferentes situaciones patológicas asociadas a alteraciones del sistema inmune. Hay que destacar que en todos los casos el fármaco se administra por vía oral y, además, carece de toxicidad (Brieva *et al.*, 2002). Es evidente que el producto ha de mantener su integridad molecular y sus propiedades fisicoquímicas a su paso por el tracto gastrointestinal, ya que de lo contrario, no sería capaz de conservar la probada actividad por esta vía de administración. Este escenario requiere una gran resistencia frente a condiciones muy extremas para las proteínas como son el pH sumamente ácido del jugo gástrico y la proteólisis enzimática. Inmunoferon[®] constituye, por tanto, una excelente alternativa en el campo de los péptidos biológicamente activos por vía oral, ya que carece de los inconvenientes que habitualmente presenta dicha vía de

administración, como son: problemas de biodisponibilidad, vida media corta, susceptibilidad a proteasas, etc (Talmadge, 1998).

A la vista de estos antecedentes hemos llevado a cabo el aislamiento, identificación y caracterización de los polipéptidos integrantes del componente proteico de la especialidad farmacéutica Inmunoferon[®], en busca de las propiedades fisicoquímicas que puedan explicar la capacidad del fármaco para retener su actividad tras el tránsito por el tubo digestivo. Además, el conocimiento detallado y la disponibilidad de preparaciones puras de estos polipéptidos supondrá una herramienta esencial para estudiar la compleja farmacología de Inmunoferon[®], prácticamente desconocida hasta la fecha, y puede sentar las bases para llevar a cabo la mejora de las propiedades farmacológicas del medicamento.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 1- Obtención de los distintos polipéptidos constituyentes del componente orgánico (AM5) del principio activo (AM3) de la especialidad farmacéutica Inmunoferon[®]. Para ello, se pondrá a punto un protocolo de purificación mediante técnicas cromatográficas que permita la obtención de preparaciones homogéneas de cada polipéptido.
- 2- Identificación y caracterización molecular de cada uno de los polipéptidos aislados de AM5 mediante las técnicas de análisis de aminoácidos, secuenciación amino terminal y espectrometría de masas.
- 3- Análisis de la estructura secundaria mediante la técnica de dicroísmo circular de los polipéptidos aislados de AM5, con objeto de poder hacer una primera caracterización de las bases estructurales de sus propiedades biológicas y quimicofísicas. Este análisis se completará con un estudio de la estabilidad conformacional de dichos polipéptidos realizando experimentos de desnaturalización inducida por agentes químicos (urea y cloruro de guanidinio), temperatura y pH.
- 4- Estudio de la estabilidad frente a las principales proteasas del tracto digestivo.
- 5- Obtención de preparaciones de proteína marcada con ¹⁵N, con homogeneidad adecuada para la determinación de su estructura tridimensional a alta resolución. Para ello:
- 6- Diseñar la secuencia de DNA que codifica para los polipéptidos mayoritarios presentes en AM5 y desarrollar un sistema de expresión adecuado con el que podamos obtener cantidad suficiente de estas proteínas, que conserven sus propiedades moleculares intactas, marcadas isotópicamente.
- 7- Estandarizar la purificación de las proteínas recombinantes mediante técnicas cromatográficas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *E.coli* y los plásmidos utilizados en el presente trabajo se detallan en la tabla 1 junto con sus genotipos y características más relevantes.

Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
TG1	{F' <i>traD36 lacIq</i> $\Delta(lacZ)$ <i>M15 proAB+/supE</i> $\Delta(hsdM-mcrB)5$ (<i>rk- mk+McrB-</i>) <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)}	Gibson, 1984
BL21	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B- m_B-</i>) gal [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ^S)	Studier <i>et al.</i> , 1990
BL21-SS	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B- m_B-</i>) gal [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ^S)ss	Este trabajo
BL21(DE3)	F- <i>ompT</i> gal <i>dcm lon hsdSB</i> (<i>r_B- m_B-</i>) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7</i> gene 1 <i>ind1 sam7 nin5</i>])	Studier <i>et al.</i> , 1990
Plásmido	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
pUC18	Ap R, <i>lac Z</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pHAT2	Ap R, promotor T7 <i>lac</i> , His6	Peränen J <i>et al.</i> , 1996
pIN-III- <i>ompA</i> -2	Ap R, promotor <i>lpp-lac Zpo</i> , secuencia <i>ompA</i>	Ghrayeb <i>et al.</i> , 1984

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo.

Los plásmidos construidos en este trabajo se mencionan a continuación y se detallan en el apartado Resultados.

- pUC-AM55

Construcción: pUC18 en el que se ha insertado el fragmento de 377 pb correspondiente a la secuencia que codifica para la proteína AM55 en los sitios *NcoI* y *HindIII*.

- pUC-3C-AM55

Construcción: pUC18-AM55 en el que se ha insertado el fragmento de 24 pb que codifica para la secuencia del sitio de reconocimiento de corte de la proteasa 3C del rinovirus humano (3CRS) delante del gen de AM55.

- pHAT2-3C-AM55

Construcción: pHAT2 en el que se ha insertado el fragmento de 406 pb que codifica para el sitio de corte 3C seguido de la proteína AM55 en los sitios *EcoRI* y *HindIII*.

- pINompA-AM55

Construcción: pIN-III-ompA-2 en el que se ha insertado el fragmento de 377 pb correspondiente a la secuencia que codifica para la proteína AM55 en los sitios *EcoRI* y *HindIII*.

3.2. Oligonucleótidos sintéticos

Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados en el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) utilizando un sintetizador automático de DNA de Pharmacia, modelo Gene Assembler Plus, de acuerdo a procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3. Medios y condiciones de cultivo

Las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 120°C durante 20 minutos y 1 atmósfera de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro. Aquellos que contenían glucosa en su composición se mantuvieron a 110 °C durante 30 minutos.

3.3.1. Medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972)

Se utilizó como medio general para el mantenimiento de cepas y purificación de plásmidos a pequeña o gran escala. Contiene bactotripton (Difco) 10 g/l, extracto de levadura (Pronadisa) 5 g/l y NaCl 10 g/l. El pH se ajustó a 7.0. Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB al que se adicionó bacto agar (Pronadisa) a 15 g/l.

3.3.2. Medio mínimo M9

La composición del medio M9 (Sambrook *et al.*, 1989) por litro es de: 6 g Na_2HPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ; 1 g NH_4Cl ; 0.5 g NaCl; 2 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M; 0.1 ml de CaCl_2 0.1M; 0.1 ml de vitamina B1 1 mg/ml (esterilizada por filtración); 0.4% (p/v) de glucosa.

3.3.3. Medio mínimo M9-casaminoácidos

Se suplementó el medio mínimo M9 con casaminoácidos (Difco) a una concentración final del 0.2% (p/v). La disolución de casaminoácidos se preparó al 10% (p/v) y se autoclavó a 120°C durante 20 minutos.

3.3.4. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones acuosas 250 veces concentradas. Las soluciones preparadas se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20°C. Los antibióticos se usaron a las concentraciones finales que se indican a continuación: ampicilina (Ap, 200 µg/ml) y novobiocina (Nov, 100 µg/ml).

La ampicilina se ha utilizado para el aislamiento, crecimiento y mantenimiento de todos los clones transformantes de las distintas cepas utilizadas. Todos los vectores utilizados son portadores del gen de resistencia *bla* que codifica para la enzima periplasmática β-lactamasa que rompe el anillo β-lactámico del citado antibiótico.

La novobiocina se ha utilizado únicamente para eliminar el plásmido pINompA-AM55 de las cepas BL21ss. Este antibiótico es un inhibidor específico de la DNA girasa bacteriana, que actúa sobre la actividad ATPasa de la subunidad B, responsable de eliminar el superenrollamiento positivo del DNA (Maxwell, 1993). El cultivo de cepas de *E.coli* en medios que contienen novobiocina en concentraciones inferiores a 200 µg/ml permite el crecimiento pero induce a la eliminación de los plásmidos que

alberga la cepa, debido a que su superenrollamiento impide su replicación (Lockshon & Morris, 1983; Wolfson *et al*, 1983; Uhlin & Nordström, 1985).

3.3.5. Condiciones de cultivo

Las bacterias (*E. Coli*) se cultivaron rutinariamente a 37°C en estufa (medio sólido) o en agitador orbital New Brunswick Scientific G24 (Edison, NJ–USA) a 250 rpm (medio líquido). El crecimiento celular en medio líquido se valoró por turbimetría a 600 nm (DO_{600nm}) en un espectrofotómetro Gilford Instruments (model Stasar III).

3.3.6. Conservación de las cepas bacterianas

El mantenimiento a corto plazo (1-4 semanas) de las estirpes de *E. coli* se realizó como cultivo sobre medio LB agar suplementado con ampicilina. Una vez crecido, la placa de cultivo se conservó sellada a 4°C. Para la conservación a largo plazo las cepas se congelaron a -80°C en medio de cultivo LB ampicilina, con glicerol al 15% (v/v).

3.4 Técnicas de manipulación de DNA

3.4.1. Aislamiento de plásmidos y fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa o de mezclas de PCR se realizó utilizando el “kit” comercial Ultrafree-DA, de Millipore, siguiendo las instrucciones y los tampones recomendados por el fabricante.

El DNA plasmídico se aisló siguiendo el protocolo adjunto al kit de extracción de DNA de plásmidos High Pure Plasmid Isolation Kit de Boehringer-Mannheim.

3.4.2. Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción utilizadas fueron suministradas por Boehringer-Mannheim y New England Biolabs.

Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas por las diferentes casas comerciales con respecto a los tampones requeridos, así como a las temperaturas y a los tiempos óptimos para una mayor eficiencia de las diferentes enzimas. En las digestiones del DNA con dos o más enzimas de restricción se empleó el tampón específico en el

que más eficientemente actuaron las enzimas utilizadas o el tampón One-Phor-All buffer Plus (Pharmacia). En los casos necesarios se añadió RNAasa A (0.5 mg/ml) y albumina de suero bovino (BSA 1 mg/ml). Posteriormente, las enzimas fueron inactivadas con un tratamiento de 10 min a 75°C.

3.4.3. Ligación del DNA

Para la ligación de fragmentos de DNA se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación o de fragmentos lineales obtenidos por PCR. La reacción se llevó a cabo añadiendo 3-5 U de DNA-ligasa del fago T4 (Boehringer-Mannheim o Promega), el tampón de ligación suministrado por la casa comercial y las concentraciones adecuadas de los DNA en un volumen final de 10-15 µl completado con H₂O. La mezcla de reacción se incubó a 16°C durante 14-16 h (ligación de extremos cohesivos), o 4°C (ligación de extremos romos). Transcurrido este tiempo, se utilizó esta mezcla para transformar células competentes de *E. coli*.

3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa

La separación electroforética de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración variable entre 0.8 y 2 % según el tamaño de los fragmentos a separar (Sambrook *et al.*, 1989), utilizándose rutinariamente una concentración de 1 % que se aumentó cuando se requería una separación de fragmentos de DNA de menor tamaño molecular.

Los geles se prepararon solubilizando en caliente la agarosa (Pronadisa) en el tampón de electroforesis TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM pH 8.1), utilizando el mismo tampón como electrolito. Antes de cargar las muestras a analizar en el gel, se les añadió 1/10 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 15 % (p/v), azul de bromofenol al 0.2 % (p/v), xilencianol al 0.25 % (p/v) y EDTA 40 mM pH 8. Las electroforesis se realizaron en una cubeta horizontal a un voltaje constante (90-120 V) durante 30-50 min. Finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución acuosa de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml durante unos 20-30 min. Los fragmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz UV (360 nm) y se fotografiaron. Como marcadores de tamaño se

utilizaron el DNA del fago λ digerido con *EcoRI/HindIII* (Boehringer-Mannheim) y marcadores de 100 pares de bases en escalera (100 Base-Pair Ladder) de Pharmacia Biotech.

3.4.5. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación PCR se realizaron en tubos de 0.2 ml con un volumen final de reacción de 100 μ l que contenía 10 μ l de tampón de reacción 10x (Perkin-Elmer), 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.1 o 1 μ M de cada oligonucleótido, 0.1 mg/ml de albumina bovina, 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (Perkin-Elmer), 0.5 unidades de *Pfu* polimerasa (Perkin-Elmer) y 73 μ l de agua destilada estéril. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Robocycler 40, de la casa comercial Stratagene. Se realizaron 20 ciclos de tres etapas de acuerdo con el siguiente programa: primera etapa de 1 minuto y 40 segundos a 95°C, para desnaturalizar el DNA, segunda etapa de 2 minutos, para la hibridación de los oligonucleótidos (a 60°C para la síntesis del núcleo central y 54 °C para el resto) y por último, la tercera de 2 minutos y 30 segundos a 72°C, de elongación o extensión de las cadenas de DNA.

3.4.6. Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) utilizando un secuenciador automático modelo ABI Prism 377 (Perkin Elmer). Para la reacción de secuenciación se utilizó el “Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit” de Applied Biosystems, y la DNA polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción se basa en el método de terminación de cadena por dideoxirribonucleotidos (Sanger *et al.* 1997; Sanger & Coulson, 1978), en este caso los cuatro terminadores de la reacción están marcados con otros tantos fluorocromos distintos. Una vez desarrollada la electroforesis de los fragmentos de DNA, un láser de argón excita a los fluoróforos y la emisión producida por éstos es recogida, interpretada y asignada a un determinado nucleótido.

3.4.7 Síntesis y clonación del cDNA codificante para AM55 mediante reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa (PCR)

Se diseñó un gen sintético basado en la secuencia cDNA de AM55 (da Silva *et al.*, 1996) para la expresión en *Escherichia coli*. El gen se construyó siguiendo el método de Di Donato (Di Donato *et al.*, 1993), utilizando ocho oligonucleótidos parcialmente solapantes de 40 a 70 bases de longitud. Los oligonucleótidos fueron diseñados teniendo en cuenta los tripletes de bases más favorecidos para la traducción en *E. coli* (Danchin & Héanut, 1997).

La longitud total de la secuencia de DNA que codifica a AM55 se dividió en dos fragmentos separados, ABCD y A*B*C*D*, (Tabla 2) los cuales tenían en común el sitio *AlwNI* (Fig. 1). Para la síntesis del núcleo central de la secuencia, los dos primeros oligonucleótidos A (o A*) y B (o B*) se utilizaron a una concentración de 0.1 μ M y se amplificaron mediante PCR siguiendo las condiciones descritas anteriormente. A continuación, se tomó una alícuota de 1/20 de los DNAs amplificados en esta primera PCR y se utilizó como molde para una segunda elongación por PCR después de añadir los oligonucleótidos C (o C*) y D (o D*) a una concentración final de 1 μ M. Cada fragmento se clonó de forma independiente en el vector de clonación pUC18. Para la extracción del DNA plasmídico se utilizó el “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Boehringer-Manheim). Los fragmentos resultantes de la digestión enzimática con

Primer	Dirección	
C	5'--3'	CCCCATGGAGTCCAAAGGCGAACGTGAGGGTTCCTCTCTCA
A	5'--3'	TGAGGGTTCCTCTCTCAGCAGTGCCGTCAGGAGGTCAGCGTAAAGATCTGTCTCTTGCGAAC
B	3'--5'	TCTAGACAGGAGAACGCTTCAATGGACGAGTCAGAGGAGGGCAGCGAGGTGACCACTTCTTCAAGACG
D	3'--5'	GACCACTTCTTCAAGACGCATACGCGCCACTGCTTTTGGTCGTTGTCCTTAGGGTCGTCGACGGG
C*	5'--3'	CCCCAGCAGTCGAGCAGTGTGTAACCAAGGTAAACAGGTACGTGACGAATGCCAGTGTGAAGCT
A*	5'--3'	GAATGCCAGTGTGAAGCTATTAATACATCGCAGAAGACCAATCCAGCAAGGCCAACTGCACGG
B*	3'--5'	CGTTCCGGTTGACGTGCCACTTCTCAGACTTGACACAACGAGTCGCGGACCACTTTAGCAAA
D*	3'--5'	CGCGACCACTTTAGCAAAAGAGGACGCCGCAAGCAACGTACGCAGTCTGGGCATGATTGATCTTCGAAGGG

Tabla 2. Secuencias y direcciones de los oligonucleótidos utilizados en la síntesis del DNA codificador de AM55

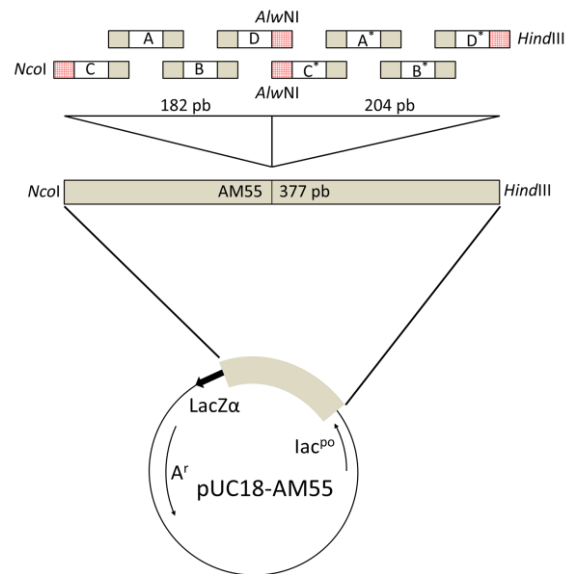


Figura 1. Construcción del plásmido pUC18-AM55. A^r, gen de resistencia a ampicilina; LacZα, gen que codifica la β-galactosidasa; lac^{po}, promotor/operador de lactosa.

A/IwNI se ligaron con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 para formar el vector final pUC18-AM55, con dianas en *NcoI* y *HindIII* (Fig. 1). Para evitar posibles errores, se hizo un análisis de la secuencia del DNA en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas utilizando un secuenciador automático ABI Prism 377 (Perkin Elmer). Comprobada la secuencia del DNA, se clonó en los distintos vectores de expresión para proceder a su posterior transformación en la cepa adecuada.

3.5. Técnicas de manipulación bacteriana

3.5.1. Obtención de células competentes de *E. coli*

Las células competentes de las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se han obtenido según el método del cloruro cálcico (Cohen *et al.*, 1972). Se sembró la cepa adecuada de *E. coli* en 5 ml de medio LB, y se cultivó toda la noche a 37°C hasta fase estacionaria. Seguidamente, se inoculó 0.5 ml en un matraz con 100 ml de cultivo LB precalentado a 37°C y se incubó durante unas 2-2.5 horas a 37°C hasta la fase exponencial de crecimiento (DO_{600nm}=0.6). Las células se recogieron por centrifugación

a 4000xg durante 10 minutos a 0-4°C, y el sedimento se resuspendió en 20 ml de una solución acuosa de CaCl₂ 50 mM estéril fría. Tras mantenerlo a 0-4°C durante 5-6 horas, se recogieron las células por centrifugación durante 5 minutos a 4000xg a 0-4°C, y se resuspendieron en 2 ml de CaCl₂ 50 mM frío. La suspensión de células competentes se repartió en alícuotas de 300 µl en tubos eppendorf estériles y se conservaron a -80°C, con glicerol al 15% (v/v). Se transformaron alícuotas de 200 µl de esta suspensión.

3.5.2. Transformación de células competentes de *E. coli*

La transformación con DNA exógeno (plásmido purificado o el producto de una reacción de ligación) se ha llevado a cabo siguiendo el método del choque térmico descrito en (Sambrook *et al.*, 1989; Sambrook & Russell, 2001). Previo al proceso de transformación, cada alícuota de células competentes se descongeló en hielo durante 15 minutos. Se añadió el DNA transformante (10-20 µl, 0.1-1 µg), se mezcló con la punta de la pipeta estéril, y esta mezcla se mantuvo en hielo durante un mínimo de 30 minutos. A continuación se dio un choque térmico, sumergiendo el vial en un baño a 42°C durante 2 minutos, y pasado este tiempo se enfrió el tubo en hielo durante 5 minutos. Seguidamente, se añadió 1 ml de LB como medio de expresión y, tras mezclar por inversión, se incubó la suspensión a 37°C durante 1 hora para que las células transformadas expresaran el gen *bla* de resistencia a ampicilina codificado en el DNA plasmídico. Alícuotas de 100 µl de esta suspensión se sembraron en placas de LB suplementado con ampicilina, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La selección de colonias positivas se realizó sobre medio sólido LB-ampicilina-IPTG-X-gal.

3.5.3. Análisis de los transformantes

Habitualmente los transformantes se analizaron sembrando cada colonia en 5 ml de LB-ampicilina, incubándose a 37°C durante toda la noche. Seguidamente se purificó el DNA plasmídico (véase apartado 3.4.1.), se digirió con enzimas de restricción adecuados y los fragmentos de DNA resultantes se separaron por electroforesis en un gel de agarosa. Analizando el tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos se determinó si los transformantes contenían la construcción plasmídica deseada. Por otro lado, el DNA plasmídico de los clones transformantes para la expresión de proteína recombinante ha sido convenientemente secuenciado.

3.5.4. Inducción de la expresión de AM55

Las cepas de *E.coli* transformadas con las correspondientes construcciones de expresión se incubaron en medio LB, medio mínimo M9 o medio mínimo M9-casaminoácidos (Sambrook *et al.*, 1989), suplementado con ampicilina durante 16 horas, a 37° C y 250 rpm. Tras este tiempo se diluyó el cultivo con medio fresco suplementado con ampicilina precalentado a 37°C y se volvió a incubar en las mismas condiciones hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor en torno a 0.4 para la expresión con el vector pINompA-AM55, o a 1 para la expresión con el vector pHAT2-3C-AM55. En ese momento se recogió una alícuota de 1 ml a tiempo cero que sirvió como control negativo de inducción. Posteriormente se indujo la expresión de la proteína añadiendo isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración 1 mM y se continuó la incubación por un período máximo de 72 horas, recogiendo alícuotas de 1 ml a diferentes tiempos (entre 30 minutos y 72 horas). Las alícuotas recogidas se centrifugaron a 12000xg durante 5 min, se separaron el sobrenadante y el sedimento y se congelaron a -20° C hasta su posterior análisis. Finalmente, el cultivo fue centrifugado a 4000xg durante 10 min, se guardaron sobrenadante y sedimento hasta su posterior estudio. Los volúmenes de los cultivos variaron entre 10 ml para pequeña escala y 1 l para escala preparativa. La expresión de proteínas se analizó separadamente en el sobrenadante y las células. En este último caso el sedimento obtenido tras centrifugar las muestras de cultivo se resuspendió en 150 μ l de H₂O Milli-Q estéril y 50 μ l de tampón de carga Laemmli (Sambrook *et al.*, 1989). Se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se centrifugó 1 minuto a 12000xg. La fase soluble se utilizó para separación por electroforesis de proteínas.

3.5.5. Expresión de AM55 marcada con ¹⁵N

La expresión de la proteína marcada con ¹⁵N se realizó en las cepas de *E.coli* BL12-SS (Apartado Resultados 4.8.2.2.) transformadas con el plásmido pINompA-AM55. El etiquetado de la proteína se llevó a cabo en medio de cultivo mínimo M9 conteniendo ¹⁵NH₄Cl (0.1 g/l) (Cambridge Isotope Laboratories) como única fuente de nitrógeno disponible. El crecimiento del cultivo se inició a partir de una alícuota de un cultivo conservado a -80°C que se inoculó en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina. La incubación se realizó durante 16 horas, a 37°C y 250 rpm. A partir de

este preinoculo, se inoculó un cultivo nuevo de 50 ml en medio M9 x3 con $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ y se volvió a incubar hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 0.8. Seguidamente, este cultivo intermedio se utilizó para inocular dos cultivos de 500 ml en el mismo medio, a una densidad óptica de 0.05 unidades a 600 nm. Cuando estos cultivos alcanzaron una densidad óptica de 0.2 se añadió isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración 1 mM para inducir la expresión de la proteína y se continuó la incubación durante 48 horas. Tras este periodo de expresión, las células se centrifugaron a 4000xg durante 10 minutos, se descartó el sedimento y el sobrenadante se guardó a -80°C hasta su procesamiento.

3.6. Técnicas de manipulación de proteínas

3.6.1 Purificación de AM55 y AM56

El aislamiento de AM55 y AM56 se realizó a partir del componente orgánico AM5 de la especialidad farmacéutica Inmunoferrón[®] (Industrial Farmacéutica Cantabria S.A.). Las proteínas se purificaron mediante un paso de cromatografía de filtración en gel seguido de una cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Los procedimientos cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo ÄKTA modelo Basic, fabricado por la compañía Amersham Pharmacia Biotech. En primer lugar la muestra (200-500 μg) se resuspendió en tampón bicarbonato amónico 150 mM, pH 7.8 y se aplicó en una columna de filtración por gel Superosa 12 HR10/30 (Pharmacia) previamente equilibrada en el mismo tampón. La cromatografía se desarrolló a un flujo de 0.5 ml·min⁻¹ y se recogieron fracciones de 1 ml. El perfil de absorbancia del eluido se monitorizó a 280 nm y el contenido proteico de las fracciones se analizó mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían las proteínas de interés se juntaron y se concentraron por liofilización. Seguidamente se realizó una cromatografía líquida de alta resolución en una columna de fase reversa C4 de 150x4.6 mm, 300 Å de tamaño de poro y 5 μm de tamaño de partícula (Vydac, The Separation Group). Antes de cargar la muestra, la columna se equilibró con una solución de ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de acetonitrilo del 0% al 70% durante 45 minutos, en TFA al 0.1% (v/v). El flujo se mantuvo a 0.5 ml·min⁻¹ y se recogieron fracciones de 1 ml. La elución se monitorizó a 280 y 214 nm, y la pureza de

las proteínas se evaluó mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían la proteína pura se juntaron y liofilizaron.

La purificación a escala semipreparativa se realizó reuniendo varios lotes resultantes de la cromatografía de filtración en gel para aplicarlos en una cromatografía de alta resolución en fase reversa semipreparativa. La columna empleada fue una C4 de 250x10 mm, 300 Å de tamaño de poro y 10 µm de tamaño de partícula (Vydac, The Separation Group), aplicándose como sistema de elución un gradiente lineal de acetonitrilo (0-70%) durante 45 minutos, en TFA al 0.1% (v/v). El flujo se fijó a 3 ml·min⁻¹ y se recogieron fracciones de 5 ml.

3.6.2. Aislamiento de las subunidades de AM55 y AM56

En primer lugar los puentes disulfuro se redujeron, para lo cual, una disolución conteniendo alrededor de 1 mg de AM55 o AM56 disuelta en tampón desnaturizante Tris-HCl 0.1 M, EDTA 2 mM, cloruro de guanidinio 6M, DTT 20 mM, pH 9.5, se mantuvo a 50°C durante 1 hora en atmósfera inerte de nitrógeno. A continuación, las cadenas reducidas se separaron mediante una cromatografía líquida de alta resolución en una columna C18 de 150x4.6 mm, 300 Å de tamaño de poro y 5 µm de tamaño de partícula (Vydac, The Separation Group) utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo del 0% al 70% durante 60 minutos, en TFA al 0.1% (v/v). De esta forma se logró separar tanto los componentes polipeptídicos como los reactivos en exceso. Antes de aplicar la muestra se le añadieron 0.5 ml de la solución de equilibrado de la columna (ácido trifluoroacético al 0.1 % (v/v)). Las fracciones correspondientes a cada una de las dos subunidades se identificaron a partir del perfil de absorbancia del eluido a 214 nm. Las fracciones conteniendo las subunidades puras se recogieron y se liofilizaron.

3.6.3. Purificación de AM55 recombinante

Las cepas recombinantes de *E.coli* BL12-SS portadoras del plásmido pINompA-AM55 (Apartado Resultados 4.8.2.2), se utilizaron para sobreproducir la proteína AM55. La cepa se cultivó en medio mínimo M9 y la expresión de la proteína se indujo según el procedimiento descrito anteriormente en el apartado 3.5.4. El cultivo se recogió por centrifugación a 4000xg durante 10 minutos. El sobrenadante resultante, que contiene la proteína AM55 secretada, se concentró unas 10 veces mediante

ultrafiltración tangencial, utilizando un filtro Ultrasette con corte de poro de 3 kDa (Filtron, Pall Gelman Science, France) y una bomba peristáltica (modelo 7518-02, Masterflex). El medio extracelular concentrado procedente de 1 l de cultivo se calentó a 90°C durante 30 minutos. Tras este tiempo se centrifugó a 4.000xg durante 10 minutos para recoger el sobrenadante, en el que se encuentra AM55, el cual se liofilizó. A continuación la muestra liofilizada se resuspendió en etanol al 80 % (v/v). Tras centrifugar a 4000xg durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado proteico se resuspendió en agua Milli-Q. La fracción resultante se centrifugó como antes y se recogió el sobrenadante altamente enriquecido en la proteína AM55 recombinante. La purificación de la proteína se llevó a cabo, entonces, mediante dos etapas cromatográficas de intercambio iónico. En primer lugar la muestra se cargó en una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada en tampón NH_4HCO_3 20mM pH 6, NaCl 200 mM. Una vez cargada la muestra, la columna se lavó con 5 volúmenes del mismo tampón. Seguidamente, este volumen no retenido, que contenía a rAM55, se aplicó en una columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con tampón NH_4HCO_3 20 mM pH 3.5. Después de lavar la columna con 5 volúmenes del mismo tampón, las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en NH_4HCO_3 20 mM pH 3.5, desarrollado durante 10 volúmenes de columna. Ambas cromatografías se llevaron a cabo a un flujo de 4 $\text{ml} \times \text{min}^{-1}$ y se recogieron fracciones de 4 ml. La presencia de proteína en las diferentes fracciones eluidas se siguió mediante la medida de la absorción a 280 nm y 214 nm, y se confirmó mediante SDS-PAGE. Todas las fracciones que contenían a rAM55 pura se juntaron, y liofilizaron, para posteriormente conservarse a -20°C hasta su uso.

3.6.4. Obtención de proteínas intracelulares

La obtención de muestras proteicas procedentes del citoplasma se llevó a cabo mediante disrupción mecánica por sonicación. Se centrifugaron 50 ml de cultivo a 4000xg durante 10 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1.5 ml de Na_2HPO_4 10 mM, EDTA 5 mM pH 7.2. Se procedió a sonicar 10 veces en un Branson Sonifier® ultrasonic cell disruptor modelo S-150D con una potencia de 130 W y una frecuencia de 20 KHz, en hielo, dando pulsos de 10 segundos con intervalos de descanso de 30 segundos. A continuación, se centrifugó el lisado celular a 12000xg

durante 10 min a 4° C y se procedió a separar las fracciones soluble e insoluble. Todas las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE.

3.6.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

La preparación de los geles de poliacrilamida y el desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo empleando una cubeta vertical Mini-Protean II y una fuente de alimentación Power Pac300, ambas de Bio-Rad. Se realizó en un sistema discontinuo, de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La dimensión de cada gel fue de 7 cm de alto, 8 cm de ancho y 0.1 cm de espesor. El porcentaje de acrilamida utilizado en el gel separador fue del 16% (acrilamida:bisacrilamida 30:1), en presencia de SDS al 0.1% (p/v). El gel concentrante contenía poliacrilamida al 4% (p/v). Las muestras se disolvieron en tampón de aplicación de electroforesis (Tris-HCl 100 mM pH 6.8, SDS 2 %, 5% glicerol y azul de bromofenol 0.05%) y, cuando fue necesario reducirlas se añadió DTT 0.1 M. Tras calentarse a ebullición durante 5 minutos, se aplicó en los pocillos entre 10-15 µl de disolución conteniendo alrededor de 2-4 µg de proteína. La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente utilizando un sistema de tampones compuesto por Tris-base 200 mM pH 8,9 el del ánodo (cubeta inferior) y Tris-base 100 mM pH 8.25, tricina 100 mM y SDS al 0.1% el del cátodo (cubeta superior) (Schägger & Von Jagow, 1987). Se aplicó una intensidad constante de 25 mA por gel, finalizando la electroforesis cuando el marcador azul de bromofenol alcanzaba el extremo inferior del gel. La tinción de los geles se realizó con azul de Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.25% (p/v), metanol al 40% (v/v), ácido acético al 10% (v/v); la eliminación del exceso de colorante se llevó a cabo por sucesivos lavados con una disolución de metanol al 20% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

Cuando la electroforesis tenía como finalidad transferir el gel resultante con el objetivo de aislar una banda y secuenciar su extremo amino, el protocolo se modificó ligeramente, de acuerdo con las indicaciones de Speicher (1998), para minimizar el riesgo de bloqueo del extremo amino terminal de la proteína contenida en dicha banda. Las modificaciones consistieron, primero, en dejar reposar los geles recién polimerizados entre 24 y 72 horas a fin de dar tiempo a la degradación de los radicales libres que se forman durante la polimerización de la acrilamida y, segundo, en la

adición de tioglicolato sódico 0,1 mM (Sigma) al tampón del cátodo con el fin de neutralizar otros radicales que se pudieran formar durante la propia electroforesis.

Como patrones de peso molecular en las electroforesis se emplearon los polipéptidos presentes en el “Poypeptide Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit” de Pharmacia (Mioglobina, 17.2 kDa; Mioglobina I+II, 14.63 kDa; Mioglobina I, 8.23 kDa; Mioglobina II, 6.38 kDa, Mioglobina III, 2.55 kDa; Mioglobina 1-14, 1.69 kDa) y las proteínas que componen la mezcla patrón preteñido de Bio-Rad (Fosforilasa b, 106 kDa; BSA, 80 kDa; ovoalbúmina, 49.5 kDa; anhidrasa carbónica, 32.5 kDa; inhibidor de tripsina, 27.5 kDa; lisozima, 18.5 kDa).

Para la estimación del peso molecular se representaron los logaritmos decimales de los pesos moleculares de las proteínas utilizados como patrón, frente a su movilidad electroforética relativa. La interpolación en la recta patrón del valor correspondiente a la proteína problema, proporcionó el peso molecular de la misma.

3.6.6. Reducción y carboximetilación de AM55

Los puentes disulfuro de AM55 se redujeron y los grupos sulfidrilo se carboximetilaron del siguiente modo: una disolución conteniendo alrededor de 2 mg de AM55 disuelta en tampón desnaturalizante A (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 2 mM, cloruro de guanidinio 6M, DTT 20 mM, pH 9.5) se mantuvo a 50°C durante 1 hora en atmósfera inerte de nitrógeno. Transcurrido este tiempo se añadió ácido iodoacético disuelto en tampón desnaturalizante B (Tris-HCl 0.7 M, EDTA 2 mM, cloruro de guanidinio 6M, pH 7.8) hasta una concentración final de 120 mM y se incubó de nuevo en oscuridad a temperatura ambiente durante 45 minutos. El exceso de ácido iodoacético y DTT se eliminó mediante diálisis en tampón NaHPO₄ 10 mM, pH 7. Cuando fue necesario, las cadenas reducidas y alquiladas se separaron en una columna C4 de fase reversa (Vydac 15 x 4.6 mm, 300 Å, 5 µm, The Separation Group) utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo del 0% al 70% en TFA al 0.1% (v/v). Las fracciones con las subunidades se recogieron y se liofilizaron. La extensión de la modificación se verificó mediante hidrólisis ácida de los polipéptidos y posterior análisis de aminoácidos.

3.6.7. Transferencia electroforética de proteínas

Los geles de poliacrilamida sobre los que se llevaron a cabo las electroforesis analíticas de proteínas a continuación se equilibraron por inmersión en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, 10% metanol (v/v), pH 8.3) (Towbin *et al.*, 1979), durante 15 minutos y agitación suave. Las membranas utilizadas fueron de nitrocelulosa (GSWP 304FO, Millipore) para la realización de western blots o de fluoruro de polivinilideno (Inmobilon-P, Millipore) para la secuenciación amino terminal de las bandas de interés. Ambas membranas fueron pretratadas de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante, antes de la transferencia. Finalizado el tiempo de equilibrado, el gel y la membrana se pusieron en contacto en un sistema de transferencia semi-seco de Hoefer, modelo TE70, en presencia del tampón de transferencia como electrolito, aplicando un corriente de 1 mA/cm^2 de gel durante 1 hora a temperatura ambiente.

Terminada la transferencia, en el caso de la membrana de PVDF, las proteínas se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.1% en 40% metanol, 1% ácido acético, durante 1 minuto aproximadamente. El exceso de colorante se eliminó lavando con una disolución de metanol al 50%. La membrana de nitrocelulosa se trató según se describe a continuación.

3.6.8. Immunodetección

La membrana de nitrocelulosa se saturó con una solución de leche desnatada en polvo al 3% (p/v) en tampón TBS (Tris-Cl 50 mM, pH 7.6, conteniendo NaCl 150 mM), durante 1 hora a 37°C y agitación suave. Tras 3 lavados de 5 minutos con TBS, la membrana se incubó con el anticuerpo primario α -His (Amershan) diluido 1:1000 en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 5 min con TBS, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra α -IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Amersham) diluido 1:10000 en solución de bloqueo. Finalmente, la membrana se lavó otras 3 veces con TBS durante 5 min y se reveló mediante la adición de 4-cloro-1-naftol en presencia de 0,025 % (v/v) de H_2O_2 en TBS, el cual adquiere color por la reacción enzimática asociada a la peroxidasa. Una vez aparecidas las bandas, la reacción se paró por inmersión de la membrana en agua destilada.

3.7. Análisis de aminoácidos

Se llevaron a cabo en un analizador automático Biochrom 20 (Pharmacia LKB Biochrom Ltd). Las muestras conteniendo alrededor de 10 µg de proteína se llevaron a sequedad en una speed vacuum y la hidrólisis se realizó a vacío, con un volumen total de 0.2 ml de HCl 6 M en fase gaseosa, conteniendo fenol al 0.1% (p/v), durante 20 horas a 110°C. Finalizado el proceso, los hidrolizados se disolvieron en 100 µl de tampón de aplicación citrato sódico pH 2.2 (Biochrom). La muestra se pasó a un tubo eppendorf de 1 ml, y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm, analizándose, posteriormente, un volumen fijo del sobrenadante de cada muestra (entre 50 y 80 µl). El análisis se efectúa mediante cromatografía de intercambio iónico de la mezcla de aminoácidos, que ha resultado de la hidrólisis ácida anterior, utilizando el sistema de tampones, la columna y los programas de separación estándar suministrados por el fabricante del equipo citado. Una reacción colorimétrica post columna con ninhidrina como agente derivatizante, llevada a cabo en régimen de flujo continuo, permite la detección a 570 y 440 nm, y la cuantificación de los aminoácidos. El número de nmoles de cada uno de ellos se calcula mediante integración del área del correspondiente pico cromatográfico comparando con los valores obtenidos para una mezcla estándar de aminoácidos. Para calcular las posibles pérdidas se utiliza una cantidad conocida de nor-leucina como estándar interno. Los análisis se procesan con el programa EZChrom Chromatography Data System (Scientific Software, Inc). A partir de los datos del análisis se determinó la composición de aminoácidos en % molar así como la cantidad de proteína hidrolizada en cada caso.

3.8. Secuenciación automática de proteínas

La secuencia amino terminal de proteínas se determinó mediante degradación automática de Edman, en un secuenciador de fase gaseosa-pulsos líquidos Applied Biosystems modelo Procise 494 en el Servicio de Química de Proteínas del CIB, utilizando la metodología convencional suministrada por el fabricante. Los derivados feniltiohidantoinicos (PTHs) de los aminoácidos fueron identificados y cuantificados mediante un analizador de PTHs, compuesto por un detector modelo 785A y una bomba modelo 140C, de la misma casa comercial. Las proteínas se transfirieron a membrana de

Immobilon-P, se recortó la banda proteica de la membrana y se aplicó directamente al secuenciador bajo las condiciones descritas (LeGendre & Matsudaira, 1988).

3.9. Espectrometría de masas

Se llevó a cabo en un espectrómetro de tiempo de vuelo MALDI-TOF Bruker, modelo BIFLEX, provisto con un láser de N₂ (337 nm). Las muestras (5-10 pmol/μl) se mezclaron con una disolución saturada de ácido 3,5 dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico) en acetonitrilo/agua (50% v/v) y 0.1% TFA. La mezcla se depositó sobre los pocillos de un portamuestras de acero inoxidable *AnchorChipTM* 600/384 TF (Bruker Daltonics) y se dejaron evaporar a temperatura ambiente. Los espectros fueron adquiridos como la suma de las señales iónicas generadas por el láser, acumulándose 100 espectros para cada experimento. La precisión en el cálculo de la masa molecular es mayor del 0.1%. Se utilizan los siguientes parámetros de medida:

▪ Polaridad:	positiva
▪ Modo de adquisición:	lineal
▪ Voltaje de aceleración (Uis1):	20.00 kV
▪ Voltaje secundario de la fuente de ionización (Uis2):	18.00 kV
▪ Voltaje de la lente (Ulen):	9.50 kV
▪ Voltaje del detector lineal (Udel):	1.45 kV
▪ Voltaje del deflector (Udefl):	2.00 kV
▪ Frecuencia de adquisición:	5.00 hZ
▪ Atenuación del láser:	50-60

3.10. Espectros de absorción ultravioleta

La obtención del espectro ultravioleta de proteínas se llevó a cabo en cubetas de 1 cm de paso óptico, empleándose un espectrofotómetro de diodos Agilent modelo 8453. El coeficiente de extinción se calculó a partir de disoluciones de las proteínas purificadas cuya concentración fue evaluada mediante análisis de aminoácidos.

3.11. Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de CD se obtuvieron en un dicrógrafo Jasco J-720 (Japan Spectroscopic Co) equipado con una lámpara de Xenón de 150 W. En los ensayos se emplearon cubetas de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico, y una concentración de proteína de 0.20 mg/ml en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.2. Los espectros son el resultado de mediciones cada 0.2 nm, a una velocidad de barrido de 50 nm/min y una anchura de banda de 1 nm. Se tomaron cinco medidas consecutivas a partir de las cuales se obtuvo un espectro medio una vez restado el blanco del tampón. La temperatura de la muestra se controló mediante una unidad peltier modelo 423S de Jasco y un baño de agua circulante Neslab RTE-110.

Los valores de elipticidad observados a cada longitud de onda se expresaron como elipticidad molar por residuo de aminoácido $[\theta]$, en $\text{grados} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. El peso molecular medio por residuo de aminoácido que se consideró para este cálculo se obtuvo a partir de la composición de aminoácidos de cada proteína. El análisis de la composición de la estructura secundaria de las proteínas se realizó usando el programa CONTINLL (Provencher & Glockner., 1981; Van Stokkum *et al.*, 1990) disponible en el servidor público DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>); (Lobley *et al.*, 2002; Whitmore & Wallace, 2004), con un conjunto de datos de referencia 43 proteínas, tal como se aplica en el programa.

3.12. Búsqueda de homología de secuencia y alineamiento con proteínas homólogas

La búsqueda de similitudes de secuencia de aminoácidos se realizó con el algoritmo BLASTP a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI) consultando los bancos de datos SwissProt, Genbank y EMBL (Altschul *et al.*, 1997).

3.13. Ensayos de estabilidad frente a proteasas

3.13.1 Hidrólisis con tripsina

La hidrólisis se realizó a partir de proteína liofilizada tras la purificación en fase reversa. La proteína sustrato se disolvió a una concentración final de 0.5 mg/ml en Tris-HCl 100 mM pH 8.5. Se añadió tripsina (Sigma) hasta alcanzar una relación en peso de proteasa a proteína de 1:25. La hidrólisis se llevó a cabo a 37°C durante 8 horas. Tras la digestión, la muestra se liofilizó para ser analizada por SDS-PAGE.

3.13.2. Hidrólisis con quimotripsina

La digestión se realizó con la proteína disuelta en Tris-HCl 20 mM pH 8.5. Se añadió quimotripsina (Sigma) a una relación en peso 1:25 con respecto al sustrato, y se incubó a 25°C durante 8 horas. El análisis de los productos resultantes se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente.

3.13.3. Hidrólisis con pepsina

Se realizó con la proteína sustrato disuelta a una concentración de 0.5 mg/ml en HCl 10 mM, pH 2. Se añadió pepsina hasta una relación en peso 1:25 con respecto a la proteína sustrato, y se incubó la mezcla en las mismas condiciones descritas para la tripsina. El producto del tratamiento se analizó por SDS-PAGE.

3.13.4 Hidrólisis con termolisina

La proteína sustrato se disolvió a una concentración final de 0.5 mg/ml en Tris-HCl 100 mM pH 6.5, CaCl₂ 10 mM. Se añadió termolisina (Boehringer Mannheim) hasta una relación en peso de proteasa a proteína de 1:50 o 1:25, y se incubó a 70°C durante 8 horas. El producto obtenido tras la hidrólisis se analizó por SDS-PAGE y cromatografía líquida de alta resolución.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento y purificación de los polipéptidos constituyentes de AM5

El principio activo de la especialidad Inmunoférón[®] es denominado AM3. Este principio activo consta de una asociación no covalente polisacárido-proteína que representa aproximadamente un 2% en peso, absorbida sobre una matriz estabilizante de sulfato y fosfato cálcicos. Los polisacáridos que lo componen se obtienen a partir de la pared celular de *Candida utilis* y los polipéptidos, de semillas no germinadas de *Ricinus communis*. A este componente orgánico de AM3 carente de la matriz inorgánica se le denomina AM5 y constituyó el material de partida empleado para aislar los polipéptidos presentes en la especialidad Inmunoférón[®].

Un primer análisis de AM5 mediante electroforesis en SDS-PAGE en condiciones no reductoras muestra un patrón de bandas en el que resaltan como componentes mayoritarios una banda de carácter difuso, de masa molecular aparente superior a 17 kDa, acompañada de otras dos bandas con velocidades de migración considerablemente mayores, que presentan masas moleculares aparentes de 7.4 kDa y 5.2 kDa respectivamente (Fig. 2C, calle 1). En condiciones reductoras, tanto la banda superior como la de 7.4 kDa desaparecen dando origen a una nueva banda difusa que migra entre los patrones de masas moleculares de 6.38 kDa y 2.36 kDa (Fig. 2C, calle 10). Dada la diferencia en masa molecular aparente entre los tres componentes detectados en condiciones no reductoras, como primer paso en el proceso de purificación se optó por llevar a cabo una cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superosa-12. Como puede observarse en el cromatograma resultante (Fig. 2A), se obtuvieron dos picos mal resueltos que forman una banda mayoritaria que denominamos FG y otros dos picos menores con menor tiempo de retención. El análisis electroforético en SDS-PAGE, tanto en presencia como en ausencia de reductores de grupos -SH, de las fracciones resultantes de esta cromatografía, puso de manifiesto que la fracción proteica presente en AM5 cromatografía toda en el pico mayoritario FG (Fig. 2C; calles 2 y 9). Los dos picos minoritarios que preceden a FG deben corresponder a especies químicas de alto peso molecular de naturaleza no proteica entre

las que podría estar incluido el componente polisacárido constitutivo de AM5 cuya masa molecular es de ~ 150000 Da.

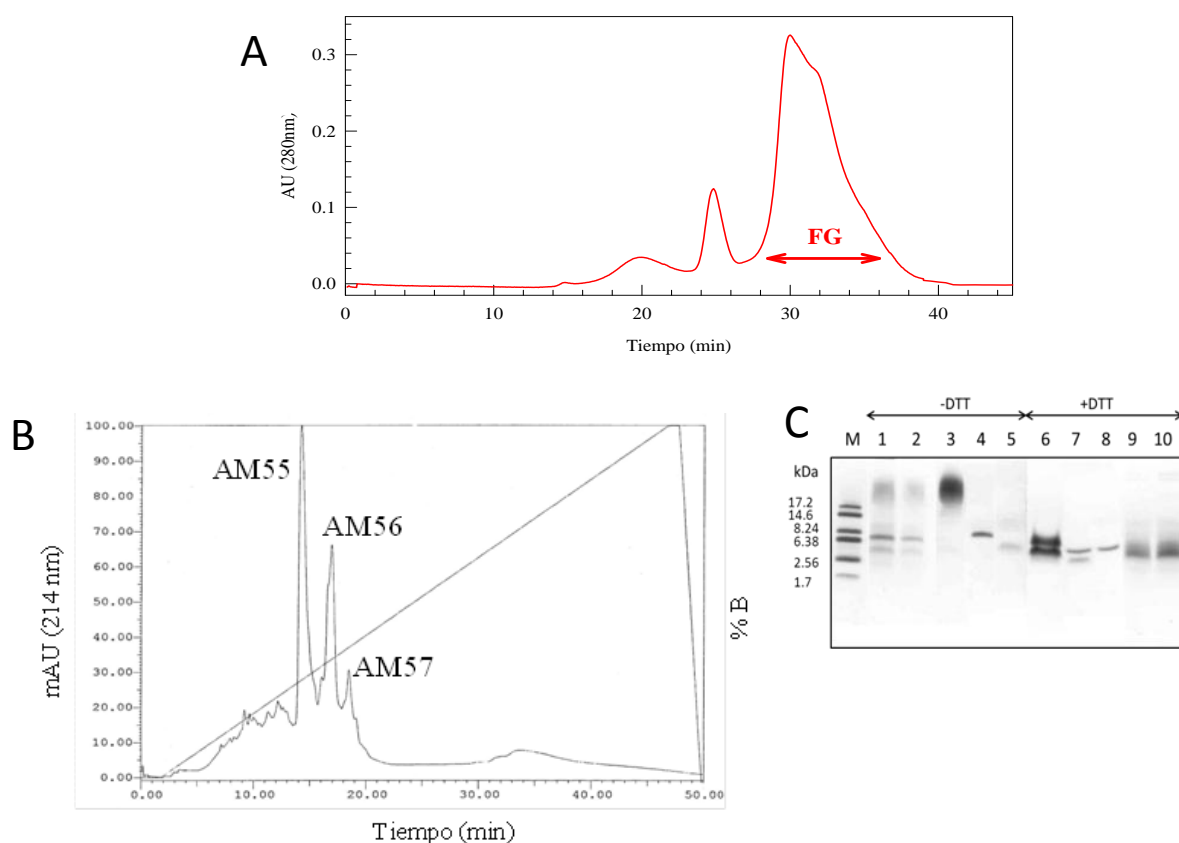


Figura 2. Análisis de las etapas de purificación de los polipéptidos de AM5. A) Registro de la cromatografía por filtración en gel de AM5 en una columna Superosa-12. Se inyectaron 200 μ g de AM5 y la absorción de las fracciones del eluido se registró a 280nm. La banda marcada FG contiene la fracción proteica de AM5. B) Registro de la cromatografía en fase reversa (columna Vydac C4) de la fracción FG. C) Análisis en SDS-PAGE (16%) con tampón tricina y tinción con azul de Coomassie de las etapas de purificación. Calles 1 y 10, AM5; calles 2 y 9, fracción FG eluida de la columna Superosa-12; calles 3 y 6, fracción AM55 eluida de la columna de fase reversa C4; calles 4 y 7, fracción AM56 eluida de la columna de fase reversa C4; calles 5 y 8, fracción AM57 eluida de la columna de fase reversa C4; M, marcadores de masa molecular.

A la vista de estos resultados, y con el fin de tratar de separar los polipéptidos integrantes de la fracción FG, se llevó a cabo una segunda cromatografía de esta fracción en columnas de alta eficiencia de fase reversa utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo del 0% al 70% en TFA al 0.1%. Como se observa en el cromatograma (Fig. 2B), esta cromatografía separa tres componentes bien definidos que hemos convenido denominar AM55 (min 14.5), AM56 (min 17) y AM57 (min 18.5). De

acuerdo con la cantidad de proteína obtenida mediante análisis de aminoácidos, AM55 representa aproximadamente el 47% de la fracción total inyectada, AM56 el 34%, AM57 el 6% y el conjunto formado por los pequeños picos que preceden a estas fracciones el 13%. El análisis electroforético en SDS-PAGE de estos tres picos confirma su homogeneidad y muestra que AM55 contiene la proteína de mayor masa molecular aparente de AM5 (Fig. 2C, calle 3), AM56 corresponde a la proteína de 7.4 kDa (Fig. 2C, calle 4) y en el pico AM57 cromatografía el polipéptido de 5.2 kDa (Fig. 2C, calle 5). En condiciones reductoras, el patrón electroforético de AM55 y AM56 se modifica, desdoblándose cada una en dos nuevas bandas (Fig. 2C, calles 6 y 7 respectivamente). Sin embargo, no se observa que la velocidad de migración de AM57 se vea alterada por la presencia del agente reductor (Fig. 2C, calle 8). La masa molecular aparente de las dos nuevas bandas procedentes de AM55 es de 6.2 y 4.6 kDa y la de las dos derivadas de AM56 de 5.2 y 3 kDa. Hay que hacer notar la coincidencia en la masa aparente de la subunidad mayor de AM56 y AM57, lo que podría indicar que se trata del mismo polipéptido. Por otra parte, la escasa diferencia existente entre las cuatro masas moleculares de las subunidades constituyentes de AM55 y AM56 sería el origen de la única banda ancha que se detecta cuando analizamos AM5 y FG en condiciones reductoras (Fig. 1C, calles 10 y 9 respectivamente).

La concentración de proteína valorada mediante análisis de aminoácidos permitió establecer que mediante este procedimiento de purificación se obtienen, en función de los diversos lotes suministrados por IFC, entre 50-29 μg de AM55, 21-10 μg de AM56 y 3-1.4 μg de AM57 por mg de peso seco procesado del principio activo AM5.

En su conjunto, estos resultados evidencian que la fracción proteica de AM5 está constituida por tres polipéptidos mayoritarios: AM55, AM56 y AM57, de los cuales AM55 y AM56 son heterodímeros que constan de dos subunidades unidas por puentes disulfuro. Estas dos proteínas representan el 80% del total y se encuentra en una relación estequiométrica AM55:AM56 que varía de ~ 5 a ~ 1.4 según los lotes analizados.

4.1.1. Separación de las cadenas de AM55 y AM56

Para llevar a cabo análisis dirigidos a una ulterior caracterización físico química de estas proteínas se hacía necesario obtener preparaciones homogéneas de cada una de las subunidades que las constituyen. Con este propósito, en primer lugar la proteína AM55 obtenida mediante cromatografía de alta resolución en fase reversa se liofilizó para conseguir eliminar el acetonitrilo y el ácido trifluoroacético, a continuación fue disuelta en tampón Tris/CIH 100 mM pH 9.5, EDTA 0.1%, cloruro de guanidinio (GnCl) 6 M, DTT 20 mM, y cromatografiada directamente, tras 1 hora de incubación a 50 °C, utilizando una columna de fase reversa C18. Como se observa en la figura 3A, se obtuvieron dos picos, AM55a y AM55b, correspondientes a las dos subunidades de AM55. El pico AM55a corresponde a la cadena de mayor movilidad electroforética y el pico AM55b a la de menor movilidad. Cabe señalar que a pesar de que el pico AM55b no es simétrico, el electroforetograma de la figura 3B no permite distinguir heterogeneidad en la preparación.

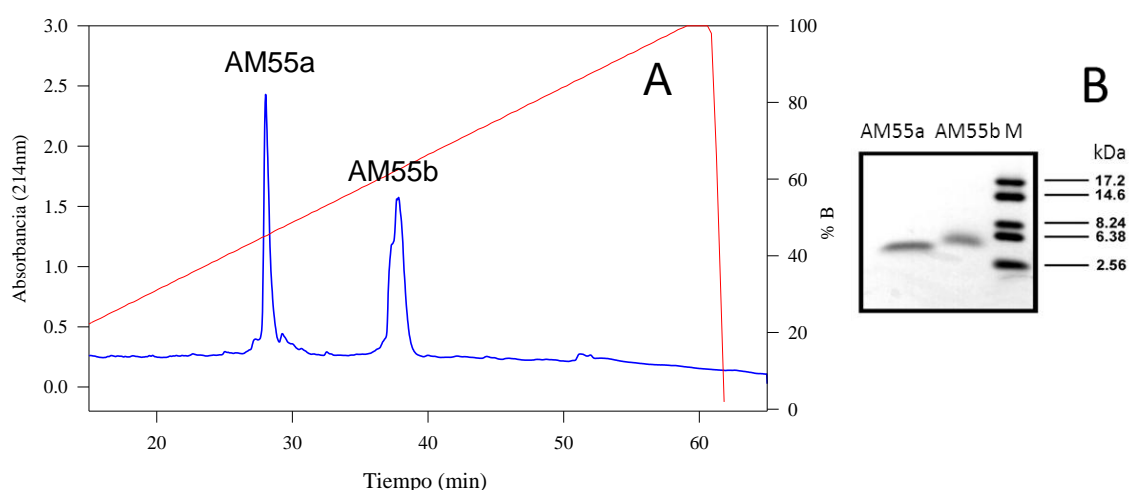


Figura 3. A) Registro de la cromatografía en fase reversa (columna Vydac C18) que separa las dos cadenas de AM55. La proteína una vez liofilizada fue disuelta en tampón Tris/CIH 100 mM pH 9.5, EDTA 0.1% cloruro de guanidinio 6 M, DTT 20 mM, y se cromatografió directamente, tras 1 hora de incubación a 50 °C. B) Análisis en SDS-PAGE (16%) con tampón tricina y tinción con azul de Coomassie de las fracciones AM55a y AM55b eluidas de la columna de fase reversa C18. M, patrones de masa molecular.

Aplicando el mismo procedimiento que se acaba de describir a AM56 se obtuvo el cromatograma correspondiente a la separación de sus dos cadenas que se recoge en la figura 4. Los dos picos obtenidos, AM56a y AM 56b, se analizaron mediante SDS-PAGE (Fig. 4B). En el gel se puede comprobar que el pico AM56a corresponde a la cadena de menor masa molecular y el pico AM56b a la de mayor.

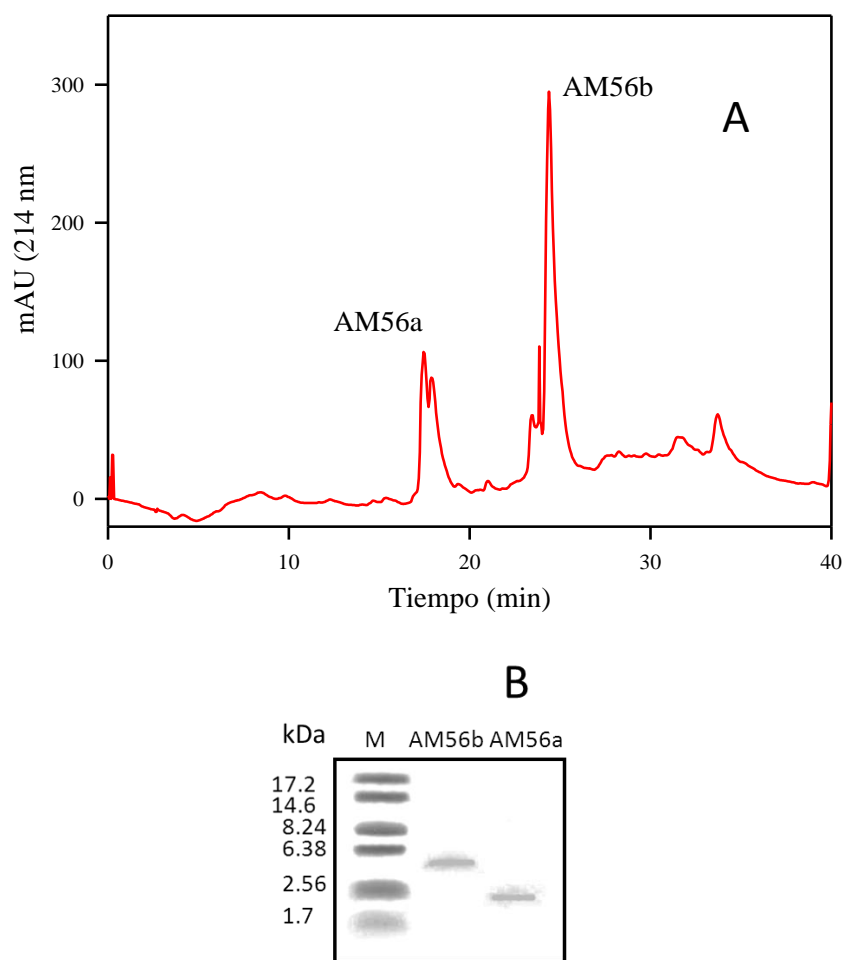


Figura 4. A) Registro de la cromatografía en fase reversa (columna Vydac C18) que separa las dos cadenas de AM56. La proteína una vez liofilizada fue disuelta en tampón Tris/CiH 100 mM pH 9.5, EDTA 0.1% cloruro de guanidinio (GnCl) 6 M, DTT 20 mM, y se cromatografió directamente, tras 1 hora de incubación a 50 °C. B) Análisis en SDS-PAGE (16%) con tampón tricina y tinción con azul de Coomassie de las fracciones AM55a y AM55b eluidas de la columna de fase reversa C18. M, patrones de masa molecular.

4.1.2. Espectrometría de masas. Determinación de la masa molecular

Para conseguir una medida más exacta de las masas moleculares de AM55, AM56 y sus respectivas subunidades se acudió a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

En el espectro obtenido en modo lineal para AM55 (Fig. 5) se observa un pico ancho en el que se aprecian varios picos en el rango de m/z comprendido entre 12000 y 12800 Da, pudiéndose distinguir dos mayoritarios con masas de 12367 Da y 12261 Da. Este resultado refleja la existencia de microheterogeneidad en la muestra.

Una situación similar, picos anchos con presencia de varios componentes, nos encontramos al analizar los espectros obtenidos para las dos subunidades constituyentes de AM55 (Fig. 5B y 5C). El espectro de la cadena corta (AM55a) presenta un pico mayoritario con un máximo a 4716 Da, acompañado de otros netamente minoritarios, mientras que en el espectro de la cadena larga (AM55b) se distinguen dos picos mayoritarios con masas de 7655 Da y 7553 Da. La diferencia de 102 Da existente entre

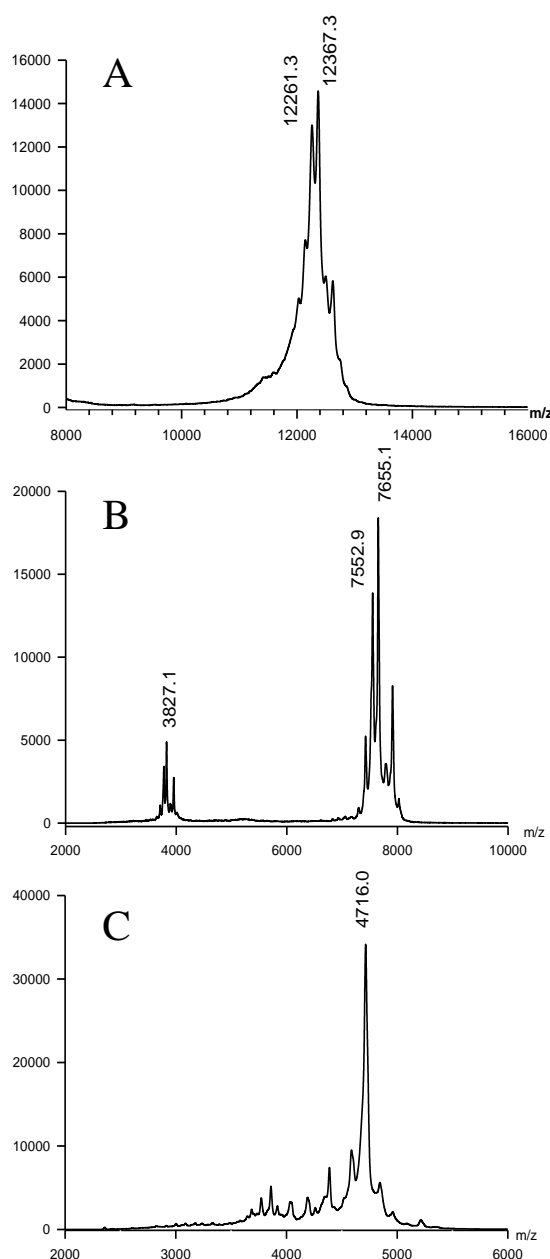


Figura 5. Registros de espectroscopía de masas de AM55 (A), AM55b (B) y AM55a (C).

ambos picos pudiera deberse a la presencia de un residuo adicional en la especie de mayor masa. Considerando la microheterogeneidad detectada, el resultado de la suma de las masas de ambas subunidades, 12371 o 12269 Da, se corresponde razonablemente bien con las masas obtenidas para la proteína intacta.

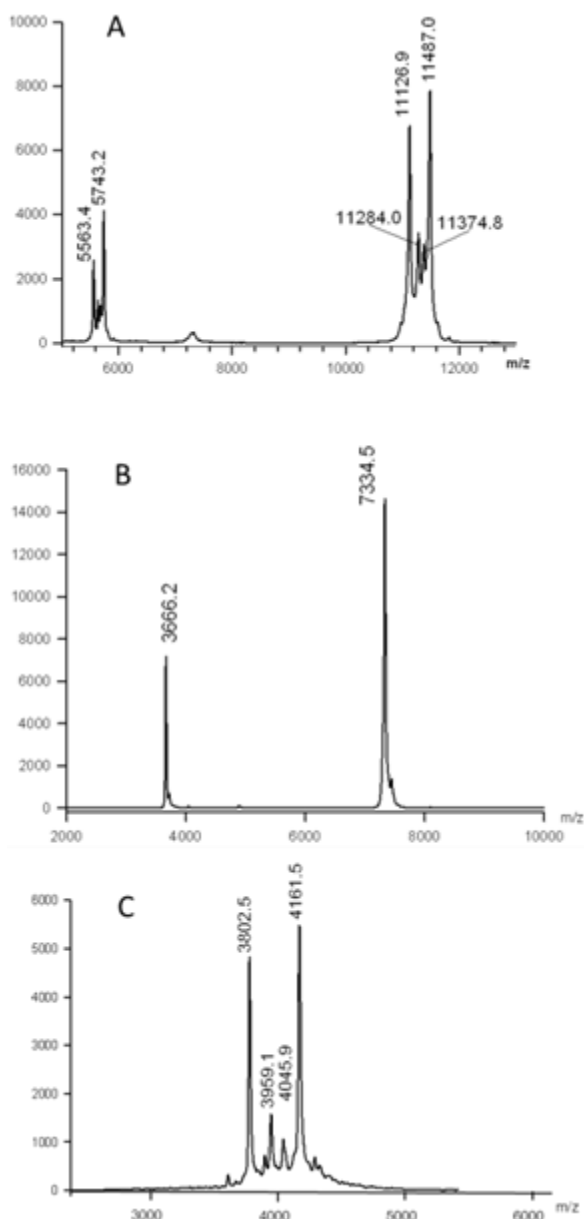


Figura 6. Registros de espectroscopía de masas de AM56 (A), AM56a (C) y AM56b (B).

El espectro recogido en modo lineal para AM56 dio como resultado dos picos mayoritarios con masas de 11487.0 Da y 11126.9 Da, y otros dos minoritarios con masas de 11374.8 Da y 11284.0 Da, respectivamente (Fig. 6A). Por su parte, el espectro de la cadena pesada mostró un único pico de masa 7334.5 Da (Fig. 6B), mientras que en el caso de la cadena ligera se diferencian cuatro picos (Fig. 6C), dos mayoritarios con masas de 4161.5 Da y 3802.5 Da, y dos minoritarios con masas de 4045.9 Da y 3959.1 Da. La suma de la masa de la cadena pesada con cada una de las cuatro masas obtenidas para la cadena ligera: 11496, 11380.4, 11293.6 y 11137 Da, concuerda notablemente bien con las masas recogidas en el espectro de AM56. Estos resultados revelan la existencia en AM56 de cuatro formas de distinta masa cuyo origen estaría en la heterogeneidad que presenta la cadena ligera.

La comparación de las masas obtenidas en estas medidas con las calculadas a partir de la movilidad electroforética pone de manifiesto que

este conjunto de polipéptidos tienen velocidades de migración anómalas en SDS-PAGE. Este fenómeno está especialmente acentuado en el caso de AM55.

4.1.3. Composición de aminoácidos de AM55 y AM56

Un primer paso dirigido a establecer la identidad de las dos proteínas mayoritarias de AM5 consistió en determinar su composición mediante hidrólisis ácida y análisis automático de su contenido en aminoácidos. Los resultados de este análisis se recogen en la tabla 3. Como se puede observar la composición de aminoácidos de ambas proteínas resultó ser muy similar, lo que sugería que debían estar estrechamente relacionadas. De la composición de aminoácidos de estas proteínas cabe destacar el alto contenido de Glx y el bajo contenido de residuos aromáticos.

<i>Aminoácido</i>	<i>Proteína predicha</i>		<i>Proteína de</i>	
	<i>AM55</i>	<i>de reserva del ricino (Ric c3)[#]</i>	<i>AM56</i>	<i>reserva del ricino (Ric c1)[#]</i>
Ala	4.4	3.7	4.2	4.0
Arg	11.1	12.1	9.9	10.1
Asx	4.8	4.7	5.7	4.0
Cys	4.2*	7.5	4.0*	8.1
Glx	31.5	31.7	31.3	30.3
Gly	7.5	5.6	8.8	9.1
His	1.2	0.9	1.1	1.0
Ile	3.2	3.7	2.8	3.0
Leu	4.5	3.7	5.7	6.1
Lys	3.5	3.7	3.1	2.0
Met	1.5	0.9	2.4	2.0
Phe	0.0	0.0	2.3	3.0
Pro	2.4	0.0	5.2	4.0
Ser	12.5	12.1	8.0	7.1
Thr	1.3	1.9	2.3	2.0
Trp	n.d.	0.0	n.d.	0.0
Tyr	1.7	1.9	0.8	1.0
Val	4.7	5.6	3.1	3.0

Tabla 3. Composición de aminoácidos de AM55, AM56 y de las proteínas de reserva del ricino.

n.d.: aminoácido no detectable por el método empleado

* Cistina

Deducido de la secuencia aminoacídica

Esta composición se comparó con la de otras proteínas cuya composición está almacenada en el banco de datos de Swiss-Prot utilizando la aplicación informática ACompIdent disponible en el servidor de internet ExPASy (Wilkins et al., 1996). El resultado obtenido puso de manifiesto que, con un alto grado de probabilidad, AM55 y AM56 eran las dos proteínas de reserva presentes en la fracción “albumina 2S” de las semillas de *Ricinus communis*. En 1982, Sharief & Li purificaron y determinaron la secuencia de amino ácidos de la primera proteína tipo albumina 2S aislada de las semillas del ricino, posteriormente Irwin et al., predijeron la existencia de una segunda proteína de reserva a partir de la secuencia del cDNA codificante para un presumible precursor común de 34 kDa cuyo procesamiento daría lugar a las dos proteínas (Irwin *et al.*, 1990). Más tarde, da Silva Jr. et al purificaron esta segunda proteína y propusieron la denominación 2S ASP-Ib y 2S ASP-Ia para designarla a ésta y a la proteína descrita por Sharif y Li, respectivamente (I de cDNA descrito por Irwin y, a o b, de primera o segunda proteína codificada por I) (da Silva Jr. *et al.*, 1996). Finalmente, en 1998, Bashir et al determinaron la secuencia primaria completa de ambas proteínas (Bashir et al., 1998), corroborando así su procedencia del precursor propuesto por Irwin *et al.* Además, establecieron que estas proteínas son alérgenos mayoritarios de las semillas de ricino, por lo que, de acuerdo a los criterios de nomenclatura establecidos por el IUIS (Allergen Nomenclature Subcommittee) (King *et al.*, 1994), denominaron Ric c3 a la proteína 2S ASP-Ia, y Ric c1 a 2S ASP-Ib. Ric c3 y Ric c1 constan de dos polipéptidos con masas moleculares de ~4 y 8 kDa y ~4 y 7 kDa, respectivamente. En la tabla 3 puede verse la alta semejanza de la composición de aminoácidos de AM55 con la composición teórica de Ric c3 y de AM56 con la proteína de reserva del ricino (Ric c1). De estos datos es importante destacar la relación 2:1 existente entre el porcentaje de cisteína teórico y el de cistinas determinado experimentalmente ya que nos indica que todas las cisteínas de estas proteínas se encuentran formando puentes disulfuro. Como veremos más tarde esta es una característica que comparten todas las proteínas de semillas de diferentes especies pertenecientes a la familia de las albuminas 2S y que tiene implicaciones estructurales muy importantes.

La correlación de la absorbencia de la muestra a 280 nm con la concentración determinada a partir de la composición global de aminoácidos permitió determinar un coeficiente de extinción en agua para AM55 y AM56 ($E_{280\text{nm}}$) de 0.46 y 0.25 $\text{mg}^{-1}\cdot\text{ml}$, respectivamente.

4.1.4. Determinación de la secuencia NH₂-terminal de AM55 y AM56

Con objeto de dejar establecido de forma más definitiva la identidad de AM55 y AM56, se procedió a determinar mediante degradación secuencial de Edman la secuencia amino-terminal de estas dos proteínas. Los resultados de este proceso permitieron identificar una secuencia mayoritaria para AM55 con los siguientes aminoácidos: ESKGERE. Esta secuencia se introdujo en el banco de datos GenBank/EMBL (Altschul *et al.*, 1997) y se analizó su homología con otras proteínas resultando que tenía un 100% de identidad con la cadena corta de la proteína predicha de reserva del ricino. En el análisis también pudo detectarse una segunda secuencia con un menor rendimiento cuyos primeros 7 aminoácidos fueron los siguientes: NQQQESQ. La diferencia de rendimiento observada en la degradación de las dos cadenas, de acuerdo con los estudios iniciales llevados a cabo con esta proteína (da Silva Jr. *et al.*, 1996), es debido a que el aminoácido del extremo NH₂-terminal de la cadena larga está modificado en forma de piroglutamina, lo que bloquea la reacción de Edman. Sin embargo en la proteína aislada a partir de AM5 una pequeña fracción de esta cadena larga no está bloqueada porque al procesarse a partir del péptido precursor no es hidrolizada justo antes de la glutamina sino en el enlace peptídico inmediatamente anterior. Por ello la secuencia que se observa no es Gln-Gln-Gln-, sino Asn-Gln-Gln-Gln-. La degradación secuencial de Edman pone de manifiesto también la existencia de cierta heterogeneidad en el extremo N-terminal de la cadena corta. Esto podría explicar en parte la microheterogeneidad observada en los espectros recogidos en los experimentos de espectroscopia de masas.

El análisis por secuenciación automática de AM56 dio como resultado la siguiente secuencia: PSQQGXRGQIQ. Esta secuencia tiene un 100% de identidad con los 11 primeros aminoácidos del extremo amino de la cadena de baja masa molecular de

la proteína de reserva del ricino si consideramos a la X del ciclo 6 como una cisteína, que es el aminoácido que ocupa dicha posición en la secuencia de esta cadena. Debe hacerse notar, que al contrario de lo que ocurre con AM55, en este caso, la cadena de alta masa molecular parece estar totalmente bloqueada pues no se obtuvo otra secuencia.

Un alineamiento de la estructura primaria de la proteína de reserva del ricino (AM56) con AM55 en base a la homología de su estructura primaria deducida del cDNA que las codifica (Irvin *et al.*, 1990) utilizando la matriz PAM250 de Dayhoff (Barker *et al.*, 1978) aparece en la figura 7.

```

AM56      P S Q Q G C R G Q I Q E Q Q N L R Q C Q
AM55 E S K G E R E G S S S Q Q C R Q E V Q R K D L S S C E

E Y I K Q Q V S G Q G P R R Q E R S L R G C C D H L K Q M
R Y L R Q S S S R R Q Q Q E S Q Q L Q Q C C N Q V K Q V

Q S Q C R C E G L R Q A I E Q Q Q S Q G Q L Q G Q D V F E
R D E C Q C E A I K Y I A E D Q I Q Q G Q L H G E E S E R

A F R T A A N L P S M C G V S P T E C R F
V A Q R A G E I V S S C G V R C M R Q T R T N

```

Figura 7. Alineamiento de los polipéptidos codificados por el RNA mensajero correspondientes a las proteínas AM55 y AM56 de acuerdo con la matriz de homología PAM250 de Dayhoff (Barker *et al.*, 1978). Los residuos idénticos van resaltados en negrita y los homólogos según la matriz PAM250 en cursiva.

4.1.5. Identificación de AM 57

Como pudimos ver en el apartado 4.1, cuando se llevaba a cabo la separación de los péptidos presentes en AM5 mediante cromatografía en fase reversa C4 (Fig. 2B), junto a AM55 y AM56 se purificaba un tercer componente minoritario que denominamos AM57. La velocidad de migración electroforética en SDS-PAGE de

AM57 coincidía con la de la cadena larga de AM56 lo que sugería que podía tratarse del mismo polipéptido. Para establecer la identidad de AM57 se determinó su masa molecular mediante espectrometría de masas, análisis de aminoácidos y secuencia amino terminal. En la figura 8 se muestra el espectro de masas de AM57. Como se observa presenta un único pico ligeramente ancho, con un máximo a 7330.29 Da. Esta masa coincide prácticamente con la obtenida para la cadena larga de AM56 (7334.5 Da).

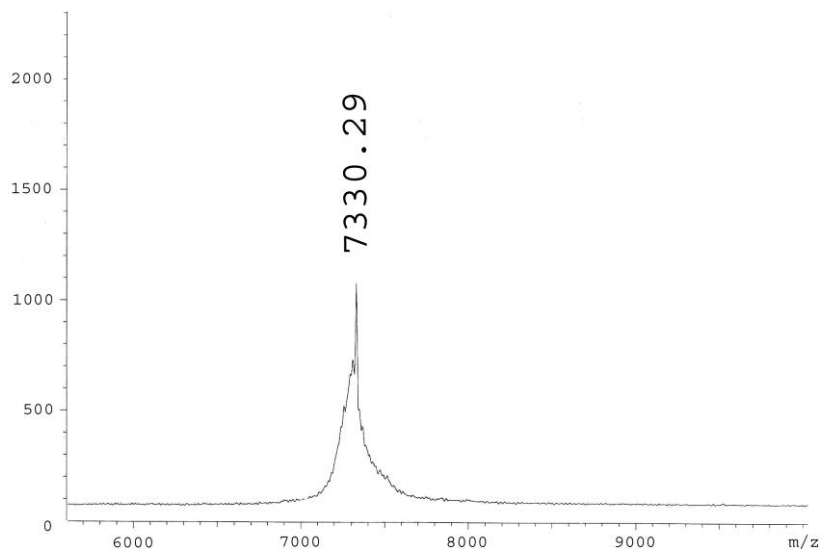


Figura 8. Registro de espectroscopia de masas de AM57.

En segundo lugar, se determinó la composición de aminoácidos de AM57 y se comparó con la de la cadena larga de AM56. El resultado de dicha comparación (tabla 4) puso de manifiesto el alto grado de semejanza entre ambos polipéptidos. Por último, se procedió a determinar mediante degradación secuencial de Edman la secuencia amino terminal de AM57, pero no se obtuvo ningún resultado. Esto indicaba que el extremo amino terminal se encuentra bloqueado, igual que sucede con la cadena larga de AM56. En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que AM57 y la cadena de mayor masa molecular de AM56 son el mismo polipéptido.

<i>Aminoácido</i>	<i>AM57</i>	<i>Cadena pesada de AM56[#]</i>
Ala	6.5	6.2
Arg	8.8	9.2
Asx	5.0	4.6
Cys	7.2	9.2
Glx	27.0	25.2
Gly	7.9	7.7
His	1.4	1.5
Ile	1.8	1.5
Leu	7.2	7.7
Lys	1.7	1.5
Met	3.5	3.1
Phe	4.1	4.6
Pro	3.7	3.1
Ser	7.9	7.7
Thr	3.2	3.1
Trp	n.d.	0.0
Tyr	0.0	0.0
Val	3.0	3.1

Tabla 4. Composición de aminoácidos de AM57 y de la cadena pesada de AM56.

Deducido de la secuencia aminoacídica

n.d.: aminoácido no detectable por el método empleado

4.2. Estudios estructurales a baja resolución

El análisis de la actividad óptica de las proteínas en disolución permite obtener información de su estructura secundaria (UV-lejano) y cierta información sobre la terciaria (UV-cercano). La conformación de una proteína, la disposición asimétrica y periódica de las unidades peptídicas en el espacio, determina un espectro de dicroísmo circular característico. El dicroísmo circular (CD) es una técnica espectroscópica muy sensible y puesto que los espectros que se obtienen dependen de la conformación de la proteína, puede ser utilizada tanto para estimar la contribución de los distintos tipos de estructura secundaria a la estructura de la proteína como para detectar cambios conformacionales inducidos por las condiciones químico-físicas de la solución (agentes desnaturalizantes, pH, temperatura, mutaciones o interacciones proteína-proteína o proteína-ligando).

Es ampliamente conocido que las estructuras secundarias típicas adoptadas por proteínas tienen espectros dicroicos diferentes en el UV lejano. La estructura de hélice α presentan dos bandas negativas que se encuentran cerca de 222 y 208 nm; y una banda positiva a 193 nm. La lámina β presenta un espectro de CD menos intenso con una banda negativa cercana a 218 nm, una positiva próxima a 195 nm y otra negativa cerca de 180 nm. Los giros β pueden presentar variedad de espectros dicroicos, pero el más común observado es el que presenta una banda negativa suave entre 220-230 nm y una banda positiva entre 200 y 210 nm. Finalmente, la forma desordenada “random coil” presenta una banda suave cerca de 220 nm y una banda negativa cerca de 200 nm. Actualmente existen diversos paquetes informáticos de acceso libre en internet con diferentes programas que permiten analizar los espectros de CD en el UV-lejano y predecir los porcentajes de estructura secundaria de la proteína en estudio.

4.2.1. Estructura secundaria de AM55 y AM56

En la figura 9 A y B se muestra un espectro típico de dicroísmo circular de estas dos proteínas en condiciones nativas a pH 7.2, así como la deconvolución de estos espectros. En ambos se puede observar la presencia de un máximo próximo a 190-193 nm y una banda negativa ancha con un doble mínimo alrededor de 208 y 220 nm, característicos de proteínas con una estructura secundaria bien definida en que

predominan los segmentos plegados en hélice α , de acuerdo a las bandas teóricas expuestas anteriormente, característica que comparten con los demás miembros pertenecientes a la familia de las albuminas 2S. Cabe señalar la extraordinaria similitud que muestran los dos espectros, no sólo en la forma sino también en los valores de elipticidad molar. A partir de los datos experimentales y utilizando el programa informático CONTINLL (Provencher & Glockner., 1981; Van Stokkum *et al.*, 1990) disponible en el servidor DICHROWEB (Whitmore & Wallace., 2004) se estimó la contribución percentual de los distintos componentes de estructura secundaria que podrían dar cuenta de los espectros de CD de AM55 y AM56, respectivamente. Como reflejan los resultados obtenidos, que se recogen en la tabla 5, AM55 y AM56 estarían plegadas de acuerdo con una topología de hélice α en un 59-62%, de lámina β en un 3%, giros β en un 11-12%, y un 26-27% de su estructura estaría desordenada. El espectro resultante del ajuste aparece también representado en la figura 9 A y B junto con su correspondiente espectro obtenido experimentalmente. La elevada semejanza entre los valores de los porcentajes de los componentes de estructura secundaria de AM55 y AM56 revela claramente que ambas proteínas comparten un plegamiento nativo virtualmente idéntico. Resultados similares se obtuvieron cuando los espectros se analizaron con el programa SELCON3 (Sreerema & Woody, 1993).

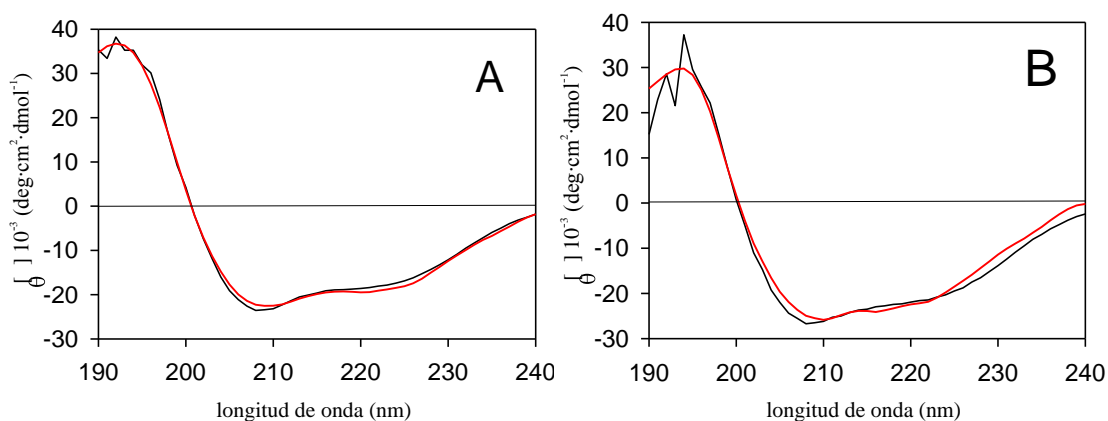


Figura 9. Espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de AM55 (A) y AM56 (B) (línea negra). La línea roja muestra el ajuste a los datos experimentales por el método CONTINLL.

Proteína	% hélice α	% lámina β	% giros β	% desordenada
AM55	59	3	12	26
AM56	62	0	11	27

Tabla 5. Estimación del porcentaje de estructura secundaria de AM55 y AM56 a partir de sus espectros obtenidos por CD usando el programa CONTINLL con la base de datos SP43 conteniendo 43 proteínas referencia globulares cuya estructura ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X.

También se realizaron análisis de dicroísmo circular de las dos subunidades que integran AM55 y AM56, para lo cual, utilizando el procedimiento descrito en el apartado 4.1.2, se procedió a preparar cantidades adecuadas de estos cuatro polipéptidos. Una vez separadas las cadenas por cromatografía en fase reversa, se liofilizaron y se redisolviaron en tampón fosfato 10 mM pH 7.2. En la figura 10 se recogen los espectros de dicroísmo de las cadenas de AM55. Como se observa, presentan una gran similitud, con el espectro típico de una proteína con estructura desordenada (random coil). Sin embargo, no se detecta el pequeño pico positivo próximo a 215 nm característico de este tipo de estructura, lo que sugeriría la existencia de un mínimo porcentaje de estructura residual. Resultados similares se obtuvieron con las cadenas de AM56.

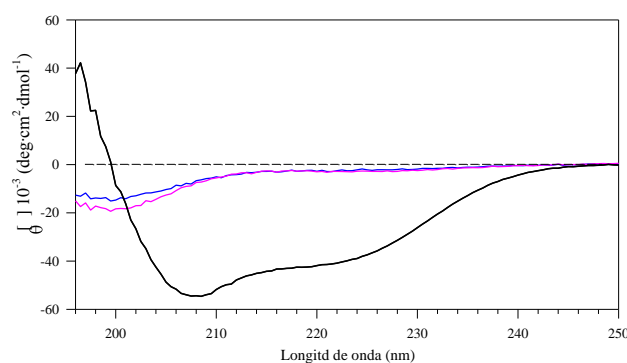


Figura 10. Espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de AM55 nativa (línea negra), de la cadena ligera (línea azul) y de la cadena pesada (línea magenta).

4.2.2. Estabilidad estructural de AM55 y AM56

Con objeto de evaluar la estabilidad estructural de AM55 y AM56 se procedió a estudiar sus espectros dicroicos en una serie de condiciones experimentales desnaturalizantes en la medida que, como hemos referido con anterioridad, la desnaturalización de la proteína tiene que producir necesariamente alteraciones de estos espectros.

4.2.2.1. Desnaturalización inducida por agentes químicos

La desnaturalización química es una de las mejores opciones para hacer una primera evaluación de la estabilidad de las proteínas. Con este fin se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se incubaron las muestras utilizando urea o cloruro de guanidinio como desnaturalizante y a continuación se registraron los espectros de CD resultantes. La urea, junto con el cloruro de guanidinio, es uno de los agentes desnaturalizantes más fuertes (Kauzmann, 1959; Schellman, 2002). Es bien conocido que la incubación de una proteína con urea puede causar una completa desnaturalización de ésta (Miller *et al.*, 1967; Tanford, 1968) que adopta las propiedades de una estructura desordenada (random coil). Sin embargo, como se muestra en la superposición de espectros recogidos en la figura 11, la presencia de urea 8 M en el medio no altera el

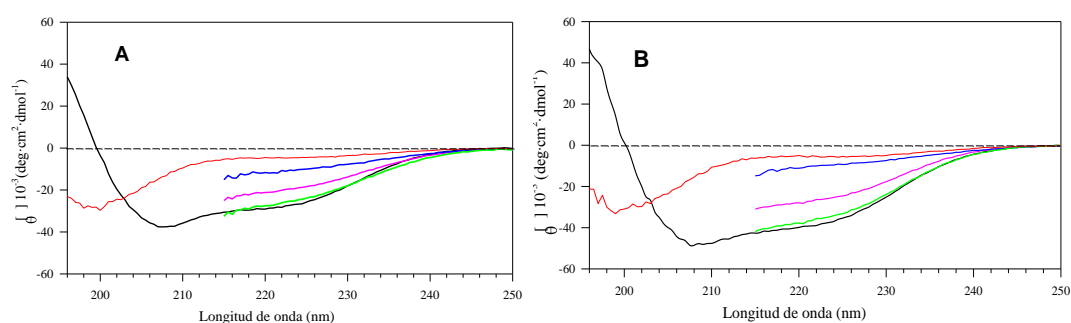


Figura 11. Espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de AM55 (A) y AM56 (B) en estado nativo (línea negra), de la proteína desnaturalizada mediante reducción de sus puentes disulfuro y posterior carboximetilación (línea roja), en presencia de urea 8 M (línea verde), urea 8 M a 90 °C (línea magenta), y en presencia de urea 8 M, β -mercaptoetanol 6.4 μ M a 90 °C (línea azul). Debido a la alta absorbencia de la muestra en presencia de urea los espectros no pudieron seguir registrándose a longitudes de onda menores que 215 nm.

espectro nativo de AM55 y AM56, lo que indica que estas proteínas presentan una gran estabilidad conformacional. Para conseguir ver una cierta modificación del espectro hubo que llevar a cabo el experimento de desnaturalización por urea a temperatura de 90°C (Fig. 11, línea magenta). No obstante, la escasa variación mostrada en la intensidad del espectro refleja que el cambio en la estructura global producto de la acción conjunta de la urea y el calor no es demasiado significativo. Según estos resultados, incluso a temperaturas de 90°C, la urea sigue sin ser capaz de modificar

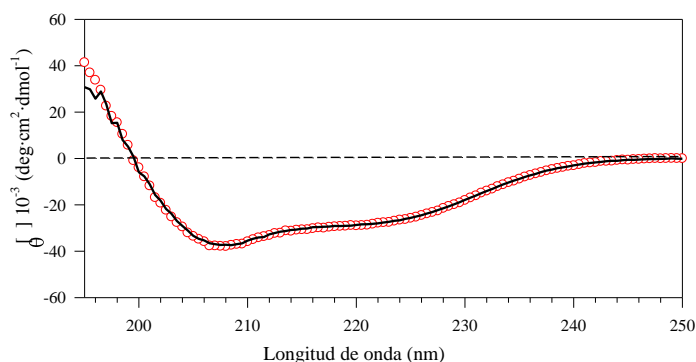


Figura 12. Espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de AM55 en estado nativo (línea negra) y de la misma muestra tras 24 horas de incubación con β -mercaptoetanol 6.4 μ M (círculos rojos).

apreciablemente la estructura secundaria del esqueleto peptídico de la proteína. Como se muestra en la misma figura 11, únicamente se lograba un aumento apreciable de la pérdida de estructura secundaria cuando en estas condiciones se añadía además β -mercaptoetanol (6.4 μ M; relación molar proteína: reductor \sim 1:4) como agente reductor de grupos $-SH$. Sin embargo, hay que resaltar que la incubación con β -mercaptoetanol sin más por un periodo de hasta 24 horas no provocó ninguna perturbación de la estructura (Fig. 12). Estos resultados ponen de manifiesto que tanto los puentes disulfuro como el empaquetamiento impuesto por la formación intramolecular de puentes de hidrógeno contribuyen muy sustancialmente a la estabilidad del plegamiento de estas proteínas, pues hay que incidir simultáneamente en los dos factores para que ésta adopte una conformación desordenada. Pese a todo, si comparamos los espectros obtenidos bajo estas severas condiciones experimentales con los de estas proteínas totalmente desnaturalizadas tras la reducción con DTT y posterior carboximetilación de los grupos $-SH$ (Fig. 11, línea roja), podemos comprobar que la desnaturalización alcanzada por el tratamiento simultáneo de urea y β -mercaptoetanol a 90 °C no llega todavía a ser total. Estos resultados sugieren que parte de los puentes disulfuro permanecen en un equilibrio dinámico oxidado/reducido que sólo es posible desplazar totalmente de su estado disulfuro cuando van siendo progresivamente

bloqueados por carboximetilación a medida que se van reduciendo. Para confirmar esta interpretación, la proteína desnaturalizada en presencia de urea 8 M y 6.4 μ M de β -mercaptoetanol a 90°C se sometió a cromatografía por fase reversa (Fig. 13). Como puede observarse, en esta cromatografía aparecía un pico único. Este dato confirma que la reducción de los grupos -SH no es total en estas condiciones.

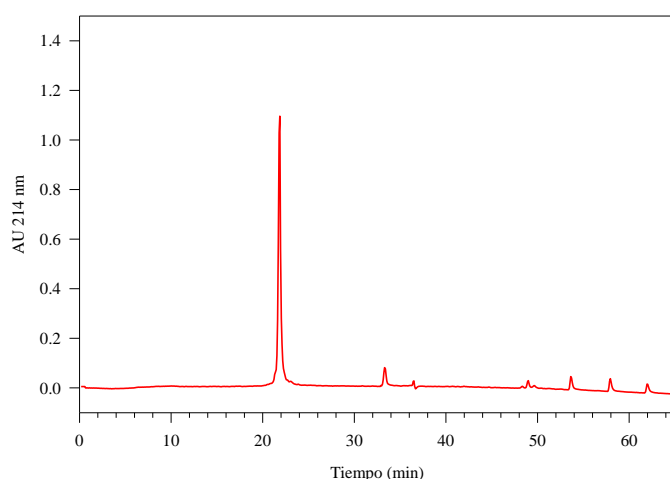


Figura 13. Registro de la cromatografía en fase reversa (columna Vydac C4) de AM55 desnaturalizada con urea 8M y β -mercaptoetanol 6.4 μ M a 90°C.

AM55 y AM56 también se mostraron altamente resistentes a la desnaturalización inducida por cloruro de guanidinio. Como se muestra en la figura 14, las dos proteínas conservan su estructura prácticamente intacta en presencia de 4 M de cloruro de guanidinio y se requiere elevar la concentración hasta 8 M para conseguir alcanzar la pérdida completa de estructura secundaria. En la misma figura podemos comprobar que este proceso es completamente reversible, recuperándose la conformación original cuando la concentración de desnaturalizante se bajaba a la mitad por dilución de la muestra. Debe destacarse que las medidas de dicroísmo se llevaron a cabo justo tras la dilución sin que mediara incubación alguna para dar lugar al replegamiento de la proteína. Cuando el efecto desnaturalizador del cloruro de guanidinio se compara con el de la urea, se pone de manifiesto que es fundamentalmente el efecto hidrofóbico el principal responsable del mantenimiento de la estructura de AM55 y AM56. Es el efecto de los componentes apolares de estas proteínas sobre la estructura del agua el que los expulsa de la solución. La proteína es forzada así a plegarse de tal forma que el enmascaramiento de estos componentes sea máximo. Cuando la estructura de puentes de hidrógeno dinámica del agua es rota por un agente caotrópico como el cloruro de guanidinio, entonces los componentes apolares no

son obligados a enmascararse y en consecuencia la proteína a plegarse para que tenga lugar este enmascaramiento. Los puentes disulfuro en estas condiciones tienen poca influencia sobre el plegamiento secundario de la proteína, como ponen de manifiesto nuestros experimentos. Sin embargo, probablemente, constituyen un modo de grapa que asegura que al inducir el enmascaramiento de los grupos apolares de nuevo (al retirar el cloruro de guanidinio) se pierdan muchos grados de libertad y se fuerce a la proteína a adquirir su estado de plegamiento original como única solución termodinámica posible.

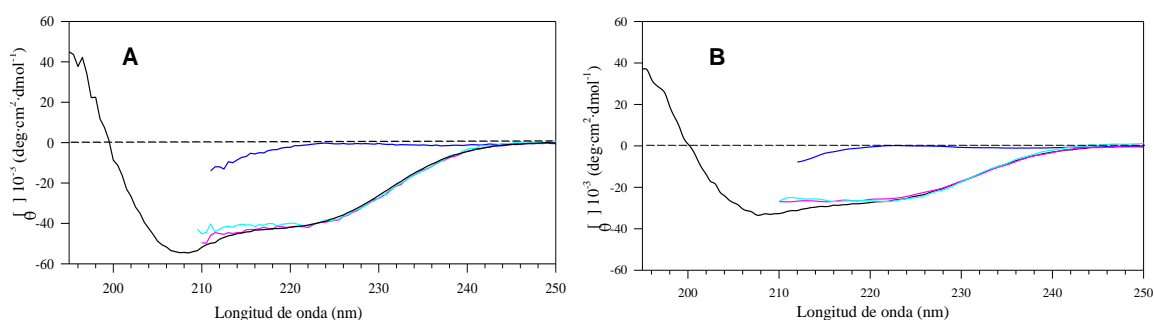


Figura 14. Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de AM55 (A) y AM56 (B) en estado nativo (línea negra), en presencia de GnCl 4 M (línea magenta), en presencia de GnCl 8 M (línea azul), y tras diluir la muestra anterior a la mitad (línea turquesa). Las medidas de las muestras diluidas se llevaron a cabo justo tras la dilución. Los espectros de estas muestras diluidas recogidos en la figura son los obtenidos en el dicrógrafo tras ser multiplicados por el factor de dilución. Debido a la alta absorbencia de la muestra algunos espectros no pudieron seguir registrándose a longitudes de onda menores que 215 nm.

4.2.2.2. Estabilidad frente a cambios de pH y temperatura

Como muestra la figura 15, el espectro característico de AM55 y AM56 no varía cuando se cambian las condiciones experimentales del análisis modificando el pH, bien sea disolviendo la muestra en tampón a pH 9 o utilizando una solución tamponadora a pH 2, lo que sugiere que la conformación de estas proteínas es muy poco sensible a las variaciones de pH del medio. Esta observación se confirma cuando comparamos los valores obtenidos para la estimación de los componentes de estructura secundaria de AM55 y AM56 en las condiciones experimentales mencionadas con los de estas proteínas en estado nativo a pH 7.2 (tabla 6). Sólo AM55 muestra una ligera

disminución en el contenido de hélice α ($\leq 8\%$) acompañada de un pequeño incremento de estructura desordenada. No obstante, las diferencias mostradas con respecto a la proteína nativa a pH neutro son mínimas, lo que nos permite concluir que la conformación no se ve perturbada en condiciones ácidas o alcalinas bastante extremas. Se estudió entonces la estabilidad térmica de ambas proteínas a estos dos pH para lo cual se recogieron los espectros de CD de las muestras tras calentar a 90°C (figura 13). Como se puede observar, el tratamiento con calor provoca un cambio en la magnitud de la elipticidad molar que está de acuerdo con la pérdida parcial de hélice α y el aumento de estructura desordenada que reflejan las estimaciones de estructura secundaria recogidas en la tabla 6. De acuerdo con estos datos, AM55 pierde alrededor del 15 % y el 45 % del contenido de hélice α cuando la temperatura alcanza 90°C y el pH del tampón de la disolución es 9 o 2 respectivamente, mostrándose por tanto algo menos estables a pH ácido, mientras que en el caso de AM56 la pérdida de hélice α a ambos pH es similar y está próxima al 40%. Esta situación se pudo revertir por completo, recuperándose de nuevo la conformación inicial cuando las muestras se dejaron enfriar a 20°C (resultados no mostrados). En conjunto, estos experimentos demuestran que estas proteínas, como otros miembros de la familia de las albuminas 2S, también se muestran extraordinariamente resistentes al calentamiento y muy estables a pH ácido o básico.

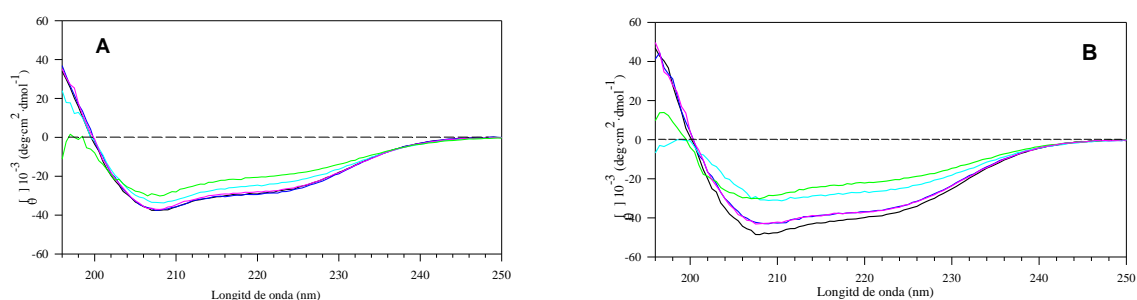


Figura 15. Espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de AM55 (A) y AM56 (B) en estado nativo (línea negra), a pH 9 (líneas azul y turquesa), y a pH 2 (línea magenta y verde). En el caso de las líneas turquesa y verde, la muestra estaba a 90°C .

Proteína	Condición experimental	% hélice α	% lámina β	% giros β	% desordenada
AM55	Nativa pH 7	59	3	12	26
	pH 9	54	2	12	32
	pH 9, 90°C	50	3	11	36
	pH 2	54	0	13	32
	pH 2, 90°C	32	10	14	44
AM56	Nativa pH 7	62	0	11	27
	pH 9	62	2	6	30
	pH 9, 90°C	39	5	14	43
	pH 2	61	1	10	28
	pH 2, 90°C	38	6	10	45

Tabla 6. Estimación del porcentaje de estructura secundaria de AM55 y AM56, a partir de sus espectros obtenidos por CD usando el programa CONTINLL.

4.3. Ensayos *in vitro* de resistencia frente a proteasas

La probada actividad del Inmunuferon[®] suministrado por vía oral sugería que AM55 y AM56 debían de ser capaces de mantener su integridad molecular durante el paso por el tracto gastrointestinal puesto que la puesta en marcha de los procesos biológicos derivados de la actividad del fármaco requieren la interacción con el tejido linfoide asociado al intestino (Guerrero *et al.*, 2000). Para comprobar la resistencia a la degradación gástrica de estas proteínas se llevaron a cabo ensayos de digestión *in vitro* con las principales proteasas gastrointestinales. En primer lugar, se sometió a AM55 a la acción digestiva de la pepsina a pH ácido. Como puede apreciarse en el análisis electroforético mediante SDS-PAGE tanto en condiciones no reductoras como reductoras (Fig.16A), tras 8 horas de incubación, AM55 permaneció aparentemente intacta, sin que se advierta variación en la masa molecular ni aparición de nuevas bandas correspondientes a péptidos producto de la acción digestiva de la pepsina, mientras que en estas mismas condiciones, la proteína control utilizada (aFGF) fue degradada totalmente (Fig.16B). A continuación se llevaron a cabo ensayos de digestión utilizando las dos principales proteasas pancreáticas, tripsina y quimotripsina. En la figura 16A se recoge el resultado obtenido después de 8 horas de incubación. Puede

verse que ambas enzimas fueron incapaces de hidrolizar de forma apreciable a AM55, aunque sí consiguieron digerir completamente a la proteína control (aFGF).

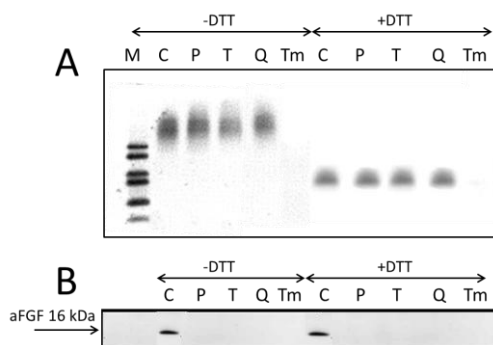


Figura 16. A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie de la resistencia a proteasas de AM55. B) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie del factor de crecimiento para fibroblastos ácido (aFGF) utilizado como proteína control y digerido en las mismas condiciones que AM55. C, control sin proteasa; P, incubación con pepsina, 8 horas a 37 °C en ClH 10 mM, pH 2; T, incubación con tripsina, 8 horas a 25 °C en Tris-ClH 20 mM, pH 8.5; Q, incubación con quimotripsina 8 horas a 25 °C en Tris-ClH 20 mM, pH 8.5; Tm, incubación con termolisina, 8 horas a 70 °C en Tris-ClH 100 mM, Cl₂Ca 10 mM, pH 6.5. Relación de proteasa:proteína (p/p) 1:25. M, patrones de masa molecular (17.2 kDa, 14.6 kDa, 8.24 kDa, 6.38 kDa, 2.56 kDa y 1.7 kDa).

La digestión con tripsina también se ensayó en presencia de 0.1 % de SDS o de urea 2 M, condiciones que no redujeron en absoluto la resistencia a la degradación mostrada en ausencia de estos agentes desnaturalizantes (resultados no mostrados). Puesto que la acción hidrolítica de las proteasas es fuertemente dependiente de la movilidad de la cadena polipeptídica atacada (Fontana *et al.*, 1986), la ausencia de hidrólisis por pepsina, tripsina y quimotripsina nos indica la inaccesibilidad de estas proteasas a los puntos de corte presentes en la proteína como consecuencia de la existencia de una estructura muy compacta. Para conseguir hidrolizar enzimáticamente a AM55 hubo que recurrir a condiciones sumamente extremas, incubando la muestra con termolisina a una temperatura de 70 °C durante 8 horas (Fig. 16A). Aun así, la proteólisis completa únicamente se logró utilizando una relación 1/25 enzima/sustrato (p/p). En los ensayos realizados con relaciones inferiores a esta siempre se detectaba proteína residual sin degradar.

El producto obtenido tras la digestión con termolisina de AM55 también se analizó mediante cromatografía de alta eficacia en una columna de fase reversa C18. El perfil de elución de los péptidos resultantes, junto al control correspondiente de la proteína sin tratar se recoge en la figura 17. Podemos comprobar que la digestión lleva a una hidrólisis prácticamente completa de AM55.

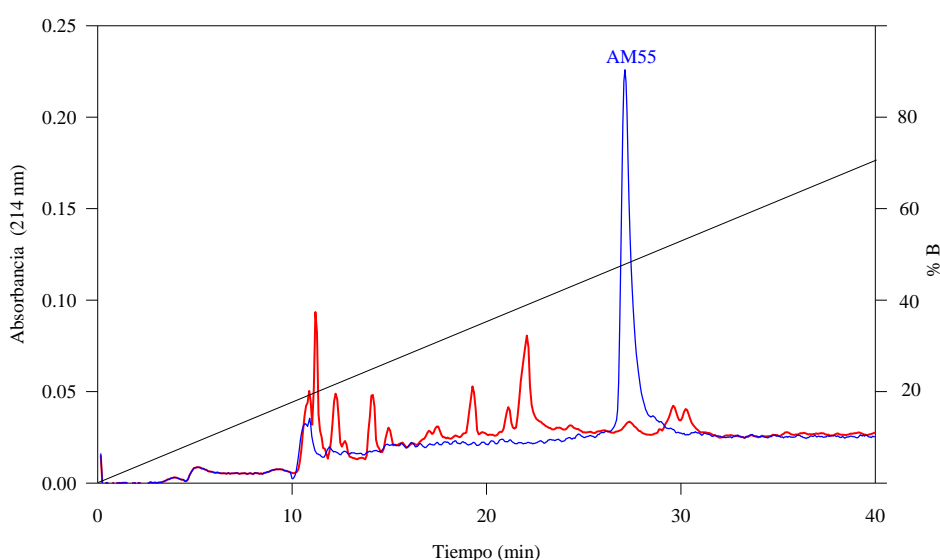


Figura 17. Registro de la cromatografía en fase reversa (columna Vydac C 18) de la digestión de AM55 con termolisina (línea roja) y del control sin proteasa (línea azul).

La hidrólisis completa también se consiguió reduciendo y alquilando previamente la proteína para separar las dos subunidades que la forman e impedir que los grupos $-SH$ formen puentes disulfuro tanto inter como intracatenarios. Este dato refuerza nuevamente la importante contribución de estos puentes en el mantenimiento de la estabilidad estructural tridimensional de estas proteínas.

Ensayos de igual naturaleza se llevaron a cabo con la proteína AM56. El análisis electroforético de los productos de digestión tras la incubación con las diversas proteasas utilizadas se recoge en la figura 18A. AM56 permanece aparentemente intacta tras la hidrólisis con pepsina, tripsina o quimotripsina, no observándose diferencias destacables respecto a la resistencia mostrada previamente por AM55 frente a estas mismas proteasas. Por otra parte, al igual que ocurría con AM55, la hidrólisis enzimática completa solamente se alcanzó incubando con termolisina a 70 °C durante 8 horas y a una relación 1/25 enzima/sustrato (p/p).

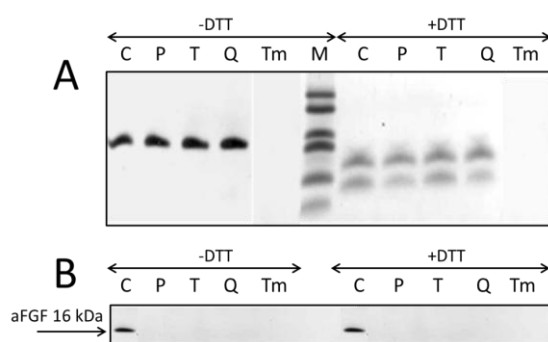


Figura 18. A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie de la resistencia a proteasas de AM56. B) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie del factor de crecimiento para fibroblastos ácido (aFGF) utilizado como proteína control y digerido en las mismas condiciones que AM56. C, control sin proteasa; P, incubación con pepsina, 8 horas a 37 °C en ClH 10 mM, pH 2; T, incubación con tripsina, 8 horas a 25 °C en Tris-ClH 20 mM, pH 8.5; Q, incubación con quimotripsina 8 horas a 25 °C en Tris-ClH 20 mM, pH 8.5; Tm, incubación con termolisina, 8 horas a 70 °C en Tris-ClH 100 mM, Cl₂Ca 10 mM, pH 6.5. Relación de proteasa:proteína (p/p) 1:25. M, patrones de masa molecular (17.2 kDa, 14.6 kDa, 8.24 kDa, 6.38 kDa, 2.56 kDa y 1.7 kDa).

La gran resistencia que muestran estas proteínas frente a la digestión por las proteasas presentes en el tracto gastrointestinal pone nuevamente de manifiesto la existencia de una estructura tridimensional sumamente estable y compacta, en cuyo mantenimiento el andamiaje que forman los puentes disulfuro juega un papel esencial.

4.4. Clonación de AM55

Dadas las interesantes propiedades terapéuticas del Inmunoferon[®], el interés de obtener esta proteína mediante técnicas de ingeniería genética parece obvio. Por esta razón pasamos a poner a punto un sistema de expresión génica de AM55 en *E. coli*. La secuencia de DNA codificante para los 121 aminoácidos que componen las dos cadenas polipeptídicas de AM55 más la secuencia de conexión entre ambas y la M inicial fue sintetizada químicamente mediante PCR siguiendo la metodología desarrollada por Di Donato (Di Donato *et al.*, 1993) con ocho oligonucleótidos parcialmente solapantes. (Fig. 1; ver Materiales y Métodos). Esta técnica además de ser rápida y económica, ofrece la posibilidad de escoger los codones más favorables para las células en las que se va a llevar a cabo la expresión e introducir dianas de restricción a lo largo de la secuencia en aquellos puntos que interese.

La longitud total de la secuencia se dividió en dos fragmentos etiquetados como CABD y C^{*}A^{*}B^{*}D^{*} de 182 y 204 pb (Fig. 1), en cuyo diseño se había incorporado un sitio de restricción *AlwNI* en el extremo 3' y 5', respectivamente. La secuencia completa del DNA resultante formado por 377 pb se recoge en la figura 19.

Una vez purificados, ambos fragmentos se insertaron independientemente en el vector de clonación pUC18 cortado en romo con *SmaI*, obteniéndose los vectores pUC18-CABD y pUC18-C^{*}A^{*}B^{*}D^{*}. La digestión de estos dos vectores con *AlwNI* libera un fragmento de 2066 pb y 1006 pb derivados del pUC18- CABD y pUC18-C^{*}A^{*}B^{*}D^{*} respectivamente (Fig. 20). Estos fragmentos, una vez purificados, se ligaron con la T4-DNA ligasa y se transformaron en células competentes de *E. coli* TG1. El plásmido resultante, con dianas en *NcoI* y *HindIII*, obtenido a partir de las colonias transformantes positivas, se denominó pUC-AM55. El DNA de 377 pb que codifica para AM55 (Fig. 20), conteniendo en sus extremos los sitios de restricción *NcoI* y *HindIII*, fue subclonado posteriormente en varios vectores. El análisis de la secuencia del plásmido recombinante pUC-AM55 obtenida por PCR puso de manifiesto que no contenía errores en la construcción.

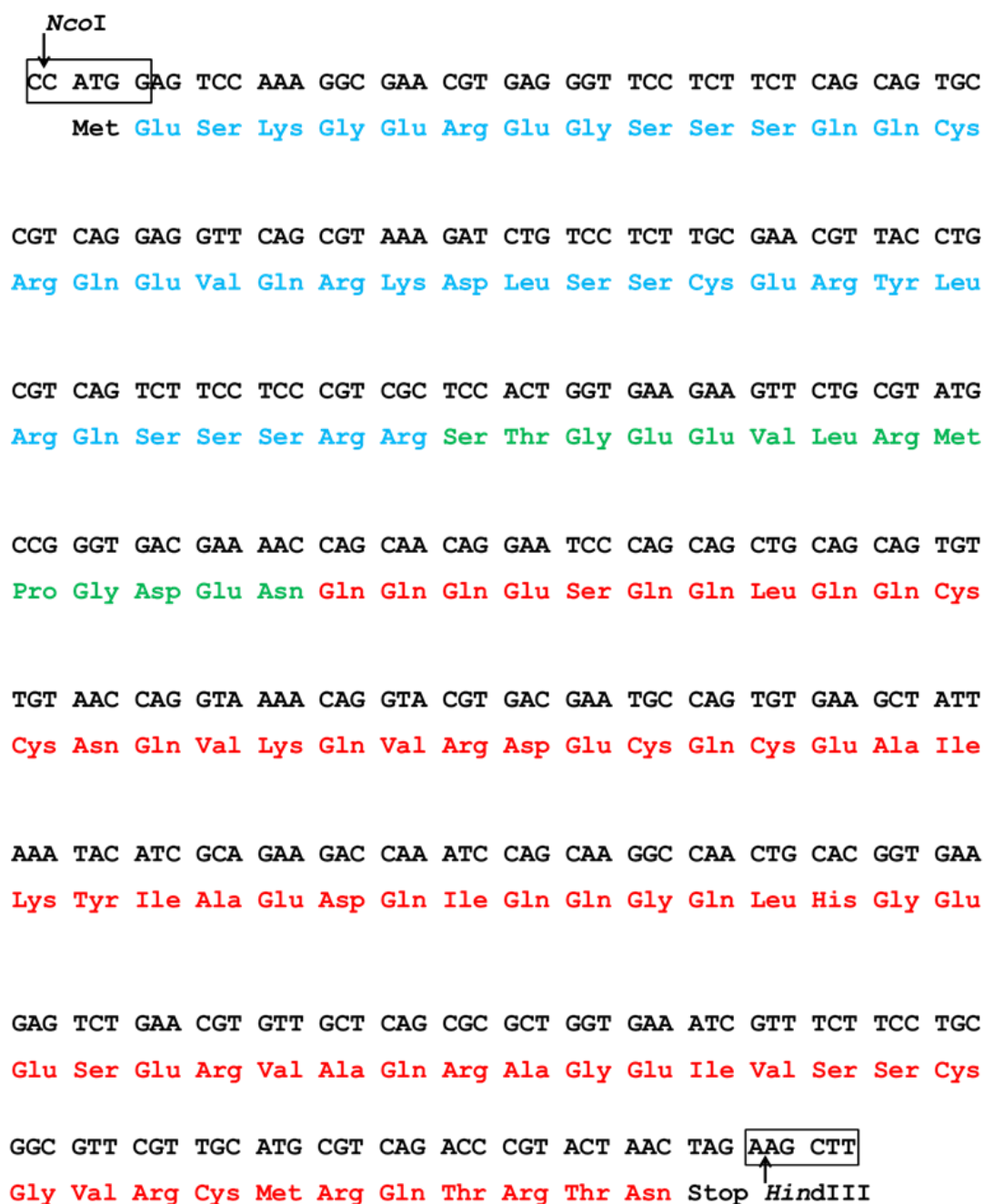


Figura 19. Secuencia de nucleótidos del gen sintético de AM55 junto con la secuencia de aminoácidos correspondiente. En cian se resalta los aminoácidos de la cadena ligera, en rojo los de la cadena pesada y en verde los del péptido de conexión entre ambas.

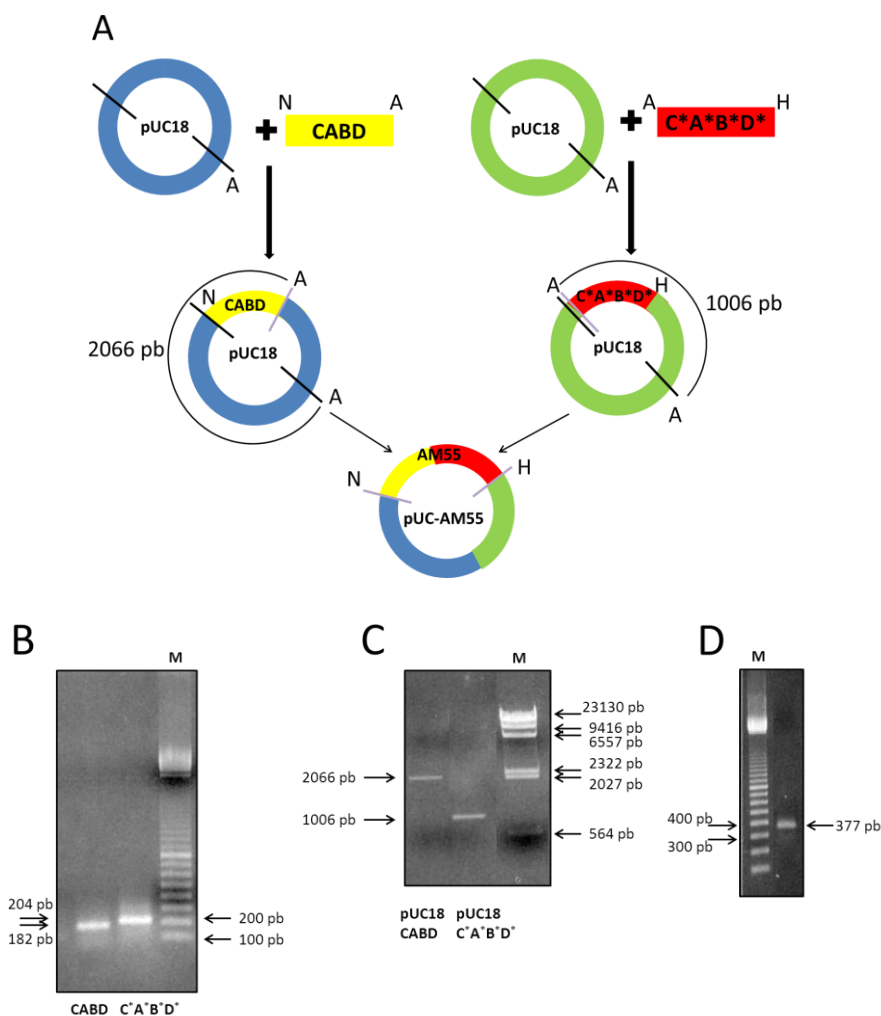


Figura 20. Representación esquemática de la construcción del plásmido pUC-AM55. A) Diseño del plásmido pUC-AM55. B-D) Electroforesis en geles de agarosa (1.5 %) de los distintos fragmentos clonados. Sitios de restricción: A, *AlwNI*; H, *HindIII*; N, *NcoI*. M: marcador de peso molecular.

4.4.1. Construcción pHAT2-AM55

Para un primer ensayo de expresión de AM55 se optó por el vector pHAT2. Esta construcción permitiría la expresión de la proteína en el citoplasma de *E.coli* como proteína de fusión con un epítipo de seis histidinas en el extremo N-terminal, lo que simplificaría su detección por medio de transferencia “Western” y la purificación posterior mediante cromatografía de afinidad en columnas que contienen matrices con níquel inmovilizado. No obstante, frente a estas indudables ventajas, la presencia de una cola de histidinas que suele encontrarse bastante expuesta al solvente y consiste en

una secuencia de seis cargas positivas con alta probabilidad de ocasionar desorden estructural y repulsiones intermoleculares supone un serio inconveniente en los análisis posteriores dirigidos a la resolución de la estructura de la proteína recombinante. Por tanto, para evitar este posible problema, es conveniente que la cola de histidinas pueda ser retirada de la proteína recombinante una vez purificada. Con este propósito, en el diseño del plásmido se incorporó un sitio de reconocimiento de corte para la proteasa 3C del rinovirus humano (3CRS) a continuación de la cola de histidinas. Para llevar a cabo esta modificación, en primer lugar el gen de AM55 recuperado a partir del plásmido pUC-AM55 digerido con las enzimas *NcoI* y *HindIII* se insertó en otro pUC18 disponible en el laboratorio conteniendo el mencionado sitio 3C. El plásmido resultante, con el gen de AM55 a continuación del sitio 3C y con dianas en *EcoRI* y *HindIII* se denominó pUC-3C-AM55 (Fig. 21). A continuación, esta construcción se cortó con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y el fragmento de 406 pb correspondiente a 3C-AM55 se purificó y se insertó en el plásmido pHAT2 cortado en los mismos sitios, generándose así el vector pHAT2-3C-AM55, en el que AM55 queda precedida del sitio 3C y la cola de histidinas (Fig. 22). De esta manera sería posible obtener AM55 con cola de histidinas, purificarla gracias a ella, y, posteriormente tratar la proteína pura con proteasa 3C para eliminarla. Esta construcción fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* BL21 (DE3).

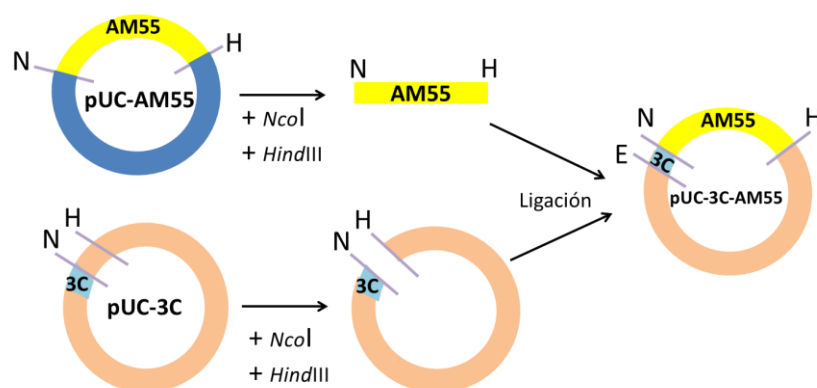


Figura 21. Representación esquemática de la construcción del plásmido pUC-3C-AM55. Las zonas coloreadas en azul y amarillo indican la secuencia que codifica el sitio de reconocimiento de la proteasa 3C y la proteína AM55, respectivamente. Sitios de restricción: H, *HindIII*; N, *NcoI*

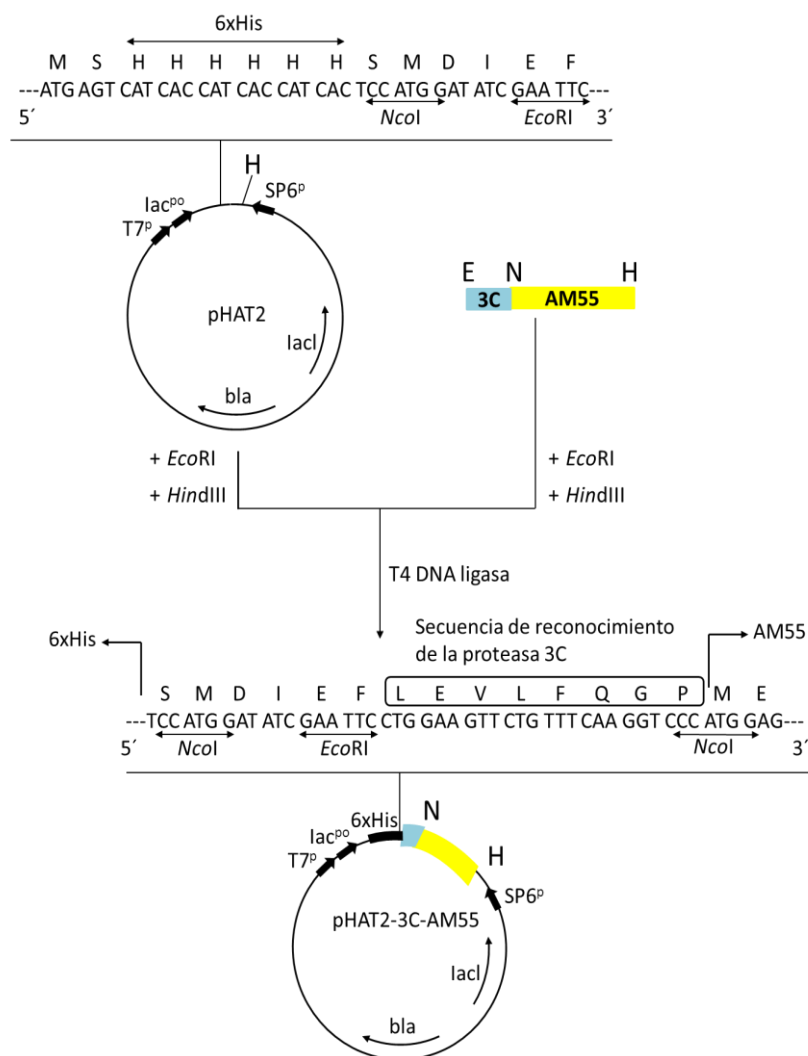


Figura 22. Representación esquemática de la construcción del vector pHAT2-3C-AM55. Las zonas coloreadas en azul y amarillo indican la secuencia que codifica el sitio de reconocimiento de la proteasa 3C y la proteína AM55, respectivamente. Sitios de restricción: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; N, *NcoI*. Otros símbolos: A^r, gen de resistencia a ampicilina; T7^P, promotor T7; bla, promotor de β -lactamasa; lac^{PO}, promotor/operator de lactosa; lacI, gen del represor lac.

4.4.1.1. Expresión

Las células transformadas con el vector pHAT2-3C-AM55 se sembraron en placas Petri de medio LB conteniendo IPTG 1 mM y ampicilina (200 μ g/ml). Después de 24 horas de incubación a 37°C apenas aparecieron colonias, mientras que en cultivos

control en presencia únicamente de antibiótico se observó un crecimiento continuo que dio lugar a la formación de un césped con abundantes colonias. Este resultado ponía en evidencia que la proteína debía ser tóxica para *E. coli* cuando se acumulaba en su citoplasma. El análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie del lisado total de las células cultivadas en medio líquido tras 24 horas de crecimiento en presencia de IPTG, no permitió distinguir la aparición de ninguna banda nueva destacable del tamaño esperado (14.4 kDa) (Fig. 23a). Sin embargo, la inmunodetección con anticuerpo anti-cola de histidina reveló la presencia en los cultivos inducidos de una banda específica del tamaño que cabría esperar para la proteína de fusión His-AM55. Esta banda aparecía en la fracción insoluble celular, no pudiéndose detectar en la fracción soluble (Fig. 23b) y correspondía a unos niveles de expresión mínimos que están de acuerdo con lo observado en las placas (sólo unas pocas células sobreviven en las condiciones de expresión, probablemente porque las proteínas forman cuerpos de inclusión en la que se acumulan desnaturalizadas). Es conocido que uno de los principales inconvenientes a la hora de expresar proteínas con puentes disulfuro en *E.coli* es que no posee un citoplasma oxidante y carece de las enzimas (disulfuro isomerasas) encargadas de formar los puentes disulfuro correctos para que la proteína adquiera su estructura tridimensional nativa. Por esta razón, en muchas ocasiones las proteínas expresadas son producidas en cuerpos de inclusión y tienen que ser replegadas a partir de su forma insoluble. Sin embargo, en nuestro caso teniendo en cuenta el bajo rendimiento de la expresión de AM55 el uso de este sistema no resultaba viable.

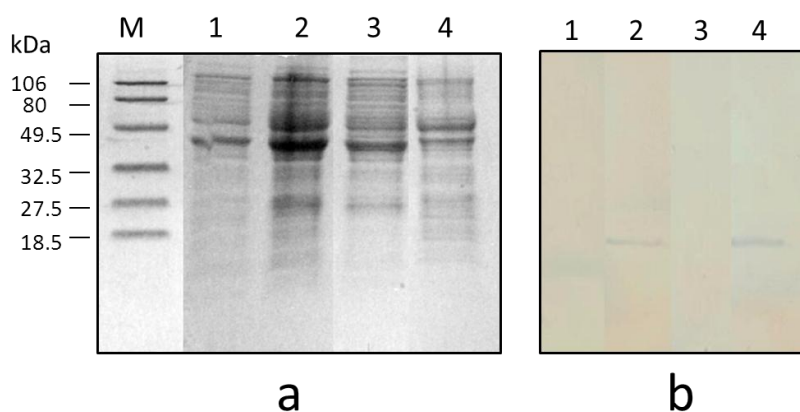


Figura 23. Expresión de la proteína de fusión His-AM55. Calles: 1, lisado total de *E. coli* BL21 (DE3) [pHAT2-3C-AM55] sin inducir; 2, tras 24 horas de inducción con IPTG 1 mM; 3, fracción soluble de 2; 4, fracción insoluble de 2. a) SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie. b) Western blot revelado con anticuerpo anti histidina. M: marcador de peso molecular

4.4.2. Construcción pINompA-AM55

En vista de los resultados obtenidos con la construcción anterior, pasamos a trabajar con otro sistema de expresión que nos permitiera que la proteína se acumulara en espacio extracelular. Para ello utilizamos vectores basados en el plásmido pIN-III-*ompA*. La proteína recombinante que se obtiene con este tipo de vectores contiene en su extremo N-terminal el péptido señal de la proteína de membrana externa *ompA* de *E. coli*. Este péptido favorece la secreción a través de la membrana plasmática de las células bacterianas. Tras ser translocada la proteína, el péptido señal es eliminado por proteasas específicas del sistema, liberándose el producto procesado en el interior del espacio periplásmico, donde están presentes las enzimas que catalizan la oxidación de cisteínas y la isomerización de cistinas. En este contexto la proteína acaba encontrando fácilmente su estructura tridimensional correcta permaneciendo soluble.

El plásmido recombinante pINompA-AM55 se construyó insertando el gen de AM55 recuperado a partir del plásmido pUC18-3C-AM55 digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* en el vector pIN-III-*ompA*-2 cortado en los mismos sitios. Este vector plasmídico además de suministrar un adecuado sitio de unión al ribosoma (RBS) y el codón de iniciación ATG, contiene el promotor *lac* de forma que la síntesis de proteína recombinante puede ser inducida mediante la adición de IPTG. Seguidamente, la construcción resultante se digirió con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* para eliminar el fragmento correspondiente al sitio 3C puesto que al no estar presente la cola de histidinas, carecía de utilidad. Los extremos 3' no protuberantes generados en la digestión se extendieron con la T4 DNA polimerasa creándose extremos romos que a continuación se ligaron con la T4 DNA ligasa. De esta manera la proteína AM55 queda inmediatamente a continuación del péptido señal de la proteína *ompA* (Fig. 24).

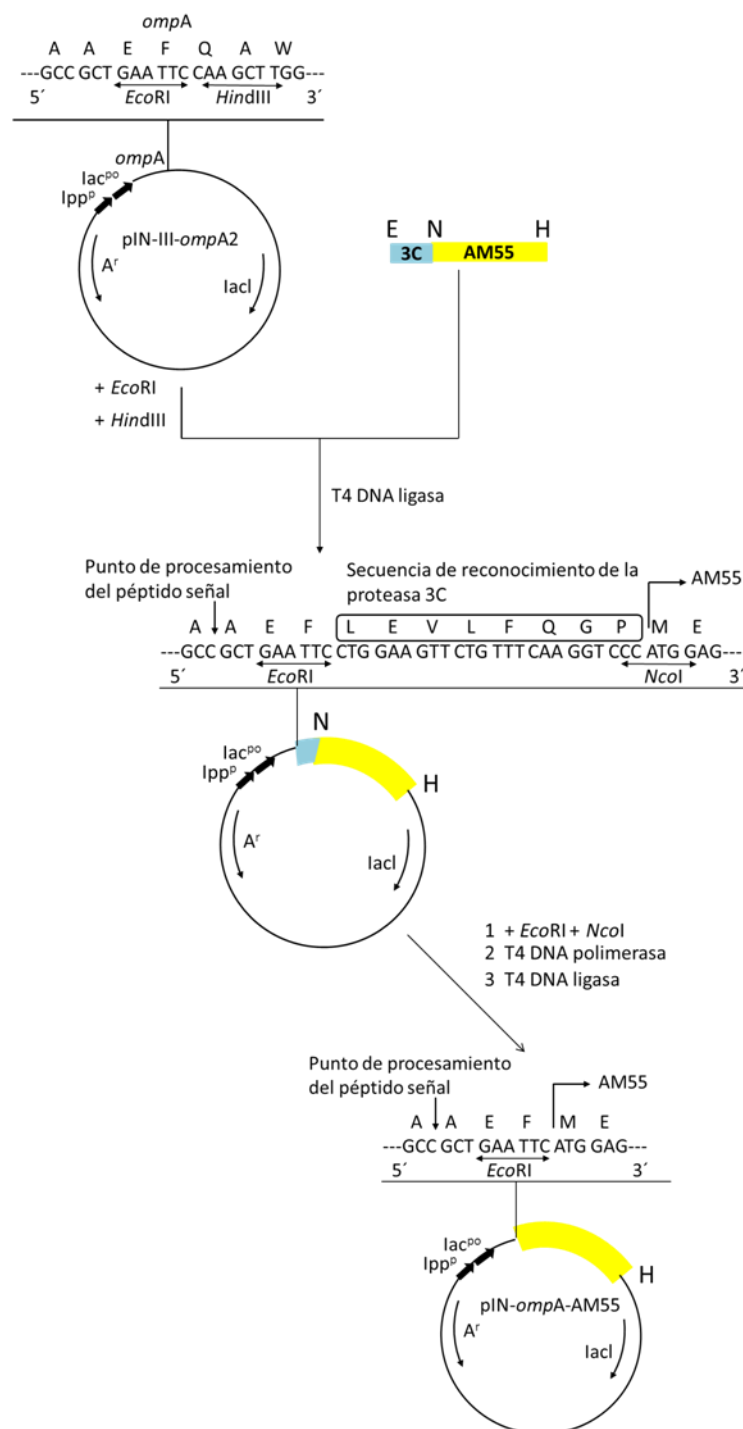


Figura 24. Representación esquemática de la construcción del vector pIN-ompA-AM55. La zona coloreada en amarillo indica la secuencia que codifica la proteína AM55. Sitios de restricción: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; N, *NcoI*. Otros símbolos: A^r, gen de resistencia a ampicilina; lpp^P promotor de lipoproteína; lac^{PO} promotor/operador de lactosa; lacI, gen del represor lac.

4.4.2.1. Expresión

Este proceso se desarrolló en varias etapas que describiremos a continuación. En primer lugar, el plásmido pINompA-AM55 se transformó en células de *E. coli* BL21. Se tomaron muestras de cultivos crecidos en medio LB a distintos tiempos (0, 24, 48 y 60 horas) y se analizó el nivel de expresión. Aunque tras 24 horas de inducir la síntesis de proteína con IPTG 1 mM ya se puede observar, en el patrón electroforético del extracto crudo teñido con azul de Coomasie, la acumulación de cantidades significativas de una proteína con la masa molecular aparente de rAM55, la máxima expresión se consigue a las 60 horas (Fig. 25). Hay que resaltar que la tasa de crecimiento de estos cultivos no se vio afectada por la acumulación de rAM55 en el periplasma, lo que indicaba que su expresión no implica toxicidad para la célula hospedadora. Por otra parte, el análisis del sobrenadante de los cultivos puso de manifiesto que, además de en el periplasma, la proteína también estaba presente en el medio de cultivo, de hecho era aquí donde se acumulaba la mayor parte (Fig. 25)

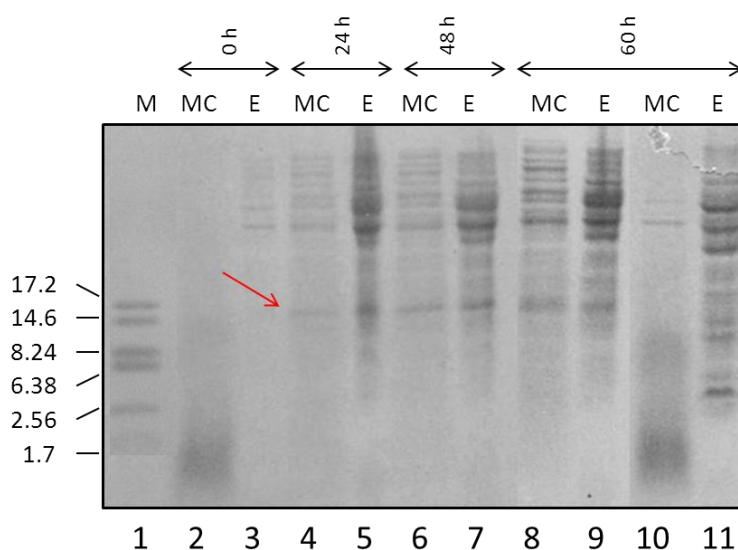


Figura 25. Expresión de AM55 recombinante en un cultivo de *E. coli* BL21[pINompA-AM55] crecido en medio LB, analizada mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie (calles 2-9). Calles 10 y 11: cepa control sin inducir. MC: sobrenadante del medio de cultivo, E: extracto crudo celular. La flecha roja denota la acumulación de AM55. M: marcador de masa molecular. Los números a la izquierda indican la masa molecular en kDa de los polipéptidos que componen M.

Para confirmar que la proteína expresada era AM55, se transfirieron las muestras a una membrana de PVDF, se recortó la banda correspondiente y se determinó la secuencia de los 10 primeros aminoácidos mediante degradación química de Edman. El resultado de la secuencia obtenida coincidió con los aminoácidos codificados por el gen construido para AM55, precedidos por los aminoácidos AEF procedentes del procesamiento del péptido señal *ompA*. Con este sistema la proteína puede ser purificada fácilmente a escala analítica a partir del medio de cultivo mediante cromatografía de fase reversa.

Una vez conseguida la expresión en medio rico LB, se realizó un ensayo de expresión en medio mínimo suplementado con casaminoácidos. Los resultados obtenidos revelaron que los niveles de acumulación de proteína en el medio de cultivo eran bastante superiores a los alcanzados con LB, de hecho la expresión a las 24 horas ya era mayor que la máxima lograda con LB (Fig. 26). Sin embargo, al tratar de expresar la proteína en medio mínimo los cultivos resultaron inviables tras inducir la síntesis de proteína con IPTG, pues al no estar inducido en estas condiciones el sistema de excreción *ompA* (Denèfle *et al.*, 1989), la proteína, envenenaba a las bacterias al quedar de nuevo en el citoplasma.

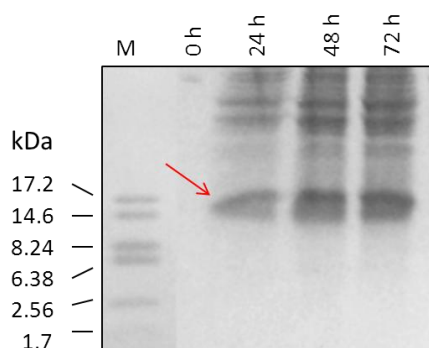


Figura 26. Expresión extracelular de AM55 recombinante en un cultivo de *E. coli* BL21[pINompA-AM55] crecido en medio mínimo M9 + 0.4% casaminoácidos, analizada mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. La flecha roja denota la acumulación de AM55. M: marcador de peso molecular.

Se aprovechó entonces la toxicidad que presenta AM55 cuando se acumula en el medio intracelular, para seleccionar cepas de *E.coli* que tuvieran constitutivamente activo el sistema de excreción. Con este fin las células transformadas con el vector pINompA-AM55 se sembraron en placas Petri de medio mínimo en presencia del inductor IPTG y ampicilina a partir de un cultivo en medio mínimo de esta cepa (sistema inspirado en la selección de la cepa C41(DE3) de Miroux (Miroux & Walker, 1996). Después de 24 horas de incubación a 37°C, se obtuvieron una media de 12

colonias/placa, mientras que en el control realizado partiendo del mismo cultivo de origen pero plaqueado en presencia de antibiótico sin IPTG se obtuvo un césped con numerosas colonias. Al analizar los niveles de expresión de estas colonias se pudo comprobar que la mayoría secretaron cantidades equivalentes de proteína al medio de cultivo, tanto cuando crecían únicamente en medio mínimo como cuando lo hacían en este medio suplementado con casaminoácidos (Fig. 27). De hecho, los niveles conseguidos de rAM55 fueron incluso mayores que los alcanzados por las células originales de las que derivan crecidas en medio mínimo suplementado con casaminoácidos. Las nuevas cepas obtenidas mediante el procedimiento detallado se denominaron BL21-SS (supersecretoras), y como acabamos de describir tienen la capacidad de crecer y producir cantidades altas de proteína soluble.

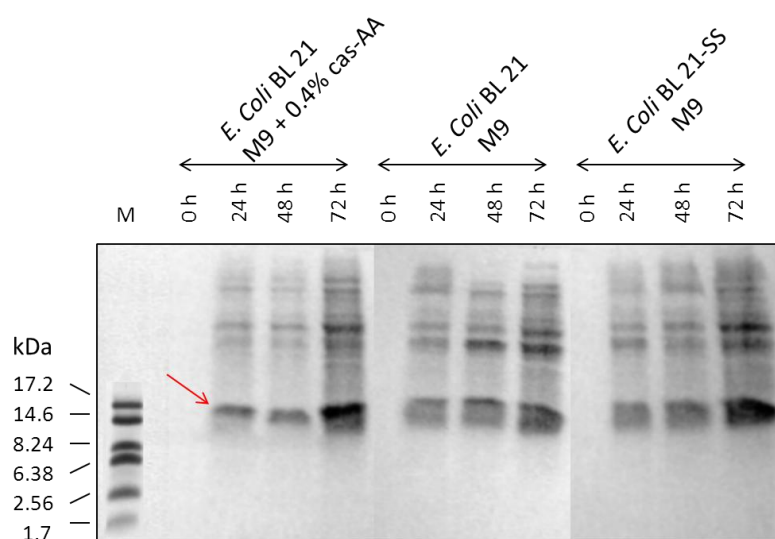


Figura 27. Expresión extracelular de AM55 recombinante en cultivos de *E. coli* BL21 [pINompA-AM55] y *E. coli* BL21-SS[pINompA-AM55], analizada mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. La flecha roja denota la acumulación de AM55. M: marcador de peso molecular.

Por último, para asegurarnos de que estas nuevas cepas son capaces de mantener el fenotipo de cepa supersecretora, un cultivo derivado de una de las 12 colonias se trató con dosis subletales del antibiótico novobiocina con objeto de eliminar el plásmido pINompA-AM55 (Uhlín & Nordström, 1985). La misma colonia se plaqueó en placas con y sin ampicilina, comprobándose que en presencia del antibiótico no crecía ninguna colonia, lo que indicaba que la cepa había perdido el plásmido. A partir de una de las colonias curadas se produjeron células competentes y se retransformó el plásmido en la

misma. Seguidamente, se realizó un ensayo de expresión en medio mínimo con ampicilina e IPTG en paralelo con la cepa supersecretora antes de curarla y con varias de las cepas obtenidas con la retransformación del plásmido pINompA-AM55. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que los niveles de expresión eran semejantes. Como veremos a continuación, AM55 se puede purificar a escala semipreparativa, mediante un proceso relativamente sencillo que incluye dos etapas cromatográficas, a partir del sobrenadante de cultivos crecidos en medio mínimo lográndose un rendimiento final superior a los 20 mg/l de cultivo.

La nueva estirpe de *E. coli* BL21-SS tiene un ámbito de aplicación muy extenso puesto que puede ser transformada con cualquier plásmido de expresión acoplada a la expulsión de la proteína del citoplasma y que codifique para cualquier proteína que interese, sea tóxica o no para la bacteria.

No obstante, nuestro objetivo final era conseguir proteína nativa marcada en cantidad y calidad suficientes como para llevar a cabo la determinación de la estructura tridimensional mediante RMN. Esta circunstancia exigía que los cultivos transformados fueran capaces de crecer en medios mínimos definidos, condición en la que la expresión con vectores de secreción es muy poco eficiente con las cepas existentes. En consecuencia, con vistas a la producción de proteína a media o gran escala, este método presentaba el inconveniente de que precisa la utilización de medios enriquecidos con casamioácidos o extracto de levadura (Denèfle *et al.*, 1989; Molina *et al.*, 1992). Con la creación de la cepa BL21-SS este problema quedaba solventado, lo que nos permitiría obtener altos niveles de expresión de rAM55 etiquetada isotópicamente para su estudio estructural por RMN, o para la realización de otro tipo de estudios, por ejemplo farmacológicos, ampliando además las posibilidades de utilización de este sistema de expresión.

4.4.2.2. Expresión de la proteína etiquetada con ^{15}N

La expresión de la proteína etiquetada con ^{15}N se realizó en bacterias *E. coli* de la cepa BL21-SS, utilizando el vector de expresión pINompA-AM55. El etiquetado de la proteína con ^{15}N se llevó a cabo en medio de cultivo mínimo que tiene $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ como

única fuente de nitrógeno. Inicialmente, con el fin de obtener la mayor cantidad de proteína posible minimizando los costes derivados del uso del $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, se probaron tres concentraciones de cloruro amónico ($\times 0.3$, $\times 1$ (0.1 g/l) y $\times 3$) en el medio de expresión. La proteína se expresó en las condiciones que ya hemos definido para esta construcción, es decir, a 37 °C 1 mM IPTG. Se tomaron muestras del medio extracelular de los cultivos a distintos tiempos (0 horas, 24 horas, 48 y 72 horas) y se analizó la extensión de la expresión mediante electroforesis en SDS-PAGE (Fig. 28). Se obtuvo una fuerte sobreexpresión en los cultivos crecidos a una concentración de NH_4Cl $\times 1$ y $\times 3$, muy similar en ambos, mientras que el cultivo crecido a la concentración $\times 0.3$ produjo una cantidad de rAM55 significativamente menor. Si bien tras 24 horas de inducción, la producción de rAM55 ya es evidente, los mejores resultados se obtuvieron a las 48 horas de expresión. A la vista de estos resultados la expresión fue optimizada a 37 °C durante 48 horas con 1 mM IPTG y $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ $\times 1$. Con estas condiciones se logra un rendimiento similar al que se consigue con la proteína sin etiquetar.

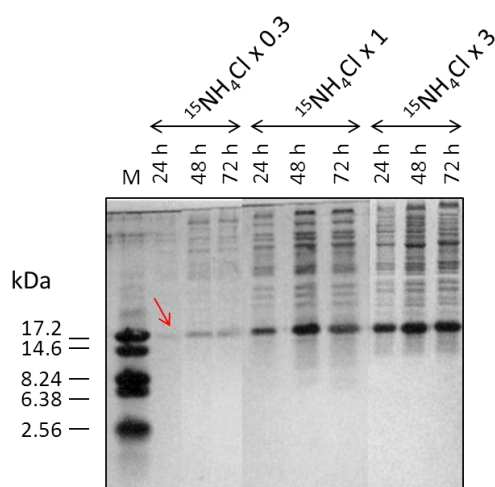


Figura 28. Expresión extracelular de AM55 recombinante en cultivos de *E. coli* BL21-SS[pINompA-AM55] crecido en medio mínimo M9, analizada mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie. La flecha roja denota la acumulación de AM55. M: marcador de peso

4.4.2.3. Purificación de AM55 recombinante

Como hemos descrito en el apartado anterior, este sistema de expresión permite la obtención de la proteína como producto de secreción en un medio de cultivo mínimo. Este hecho facilitó considerablemente su purificación, puesto que el medio original contiene bastante menos proteínas y en menor concentración que el interior celular y

está mucho más limpio de otros contaminantes no proteicos, entre los que cabe destacar pigmentos, lípidos y carbohidratos que aparecen en los medios ricos y que pueden resultar difíciles de eliminar en la purificación. Dicha purificación se llevó a cabo en dos fases, una primera destinada a reducir al máximo los contaminantes proteicos y no proteicos de baja masa molecular y otra posterior consistente en dos etapas cromatográficas. La primera fase comenzó concentrando el medio extracelular procedente de 1 l de cultivo unas 10 veces mediante ultrafiltración con un filtro de corte molecular de 3 kDa. A continuación se aprovechó la ventaja que supone la estabilidad térmica de rAM55 para precipitar la mayor parte posible de proteínas contaminantes, para lo cual la muestra se mantuvo a temperatura de 90°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra, se recuperó el sobrenadante mayoritariamente enriquecido en rAM55 (Fig. 29, calle 2) y el sedimento con las proteínas contaminantes precipitadas se descartó. Seguidamente, con el fin de eliminar subproductos arrastrados durante los pasos previos que pueden interferir en la siguiente etapa de purificación, se concentró la muestra mediante liofilización y se volvió a precipitar, esta vez en etanol al 80% (v/v). El precipitado proteico así obtenido se recuperó por centrifugación y se resuspendió en agua Milli Q. Finalmente, esta fracción se centrifugó de nuevo y se recogió el sobrenadante altamente enriquecido en rAM55 (Fig 29, calle 3) a partir del cual se purificó la proteína mediante dos pasos de cromatografía de intercambio iónico. En el primer paso, la muestra se aplicó en una columna de intercambio aniónico (Hitrap Q, Amersham-Pharmacia) en tampón NH_4HCO_3 20 mM, NaCl 200 mM, pH 6, y se recogió el material no retenido. A continuación, las proteínas retenidas se eluyeron en un único paso con NaCl 1 M. Se registró la absorbancia a 280 nm y se analizaron las fracciones recogidas mediante electroforesis en SDS-PAGE. Como se puede comprobar, a este pH, la mayoría de las proteínas quedaban inmovilizadas en este tipo de columna, mientras que rAM55 no interaccionaba con la resina, recuperándose en la fracción de material no retenido (Fig. 29, calle 4). En segundo lugar, la fracción que contenía la proteína rAM55 se aplicó en una columna de intercambio catiónico en sulfo propil sepharosa (Amersham-Pharmacia) y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M en acetato amónico 20 mM, pH 3.5 a 4 ml/min durante 50 minutos. El perfil de elución mostró un pico único que como puso de manifiesto su análisis electroforético en SDS-PAGE contenía a rAM55 con un alto grado de pureza (Fig. 29, calle 5).

El análisis electroforético de las distintas fracciones obtenidas después de cada etapa de purificación de rAM55 se muestra en la figura 29. El rendimiento en la producción de rAM55, al final de la purificación, obtenido mediante análisis de aminoácidos está en un rango entre 20-30 mg por litro de cultivo celular.

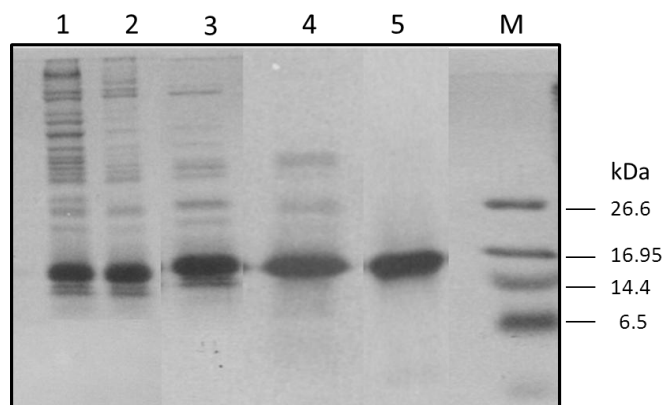


Figura 29. Análisis en SDS-PAGE (16%) con tampón tricina y tinción con azul de Coomassie de las etapas de purificación de rAM55. Calle 1, medio extracelular después de la ultrafiltración a través de membrana de 3 kDa; calle 2, sobrenadante después de precipitar a 90°C durante 30 minutos; calle 3, fracción soluble en agua después de precipitar en etanol al 80 % que se carga en la columna Hitrap Q; calle 4, proteína no retenida en la columna Hitrap Q; calle 5, proteína rAM55 eluida de la columna sulfo propil sepharosa. M, marcadores de masa molecular.

4.5. Caracterización molecular de rAM55

La proteína recombinante purificada se sometió a una serie de análisis utilizando distintas técnicas con el objetivo de llevar a cabo su caracterización molecular y confirmar que mantenía las mismas propiedades que la proteína nativa.

4.5.1. Espectrometría de masas

La masa molecular de rAM55 se determinó mediante espectrometría MALDI-TOF. Como se observa en la figura 30, se obtuvo un solo pico homogéneo de 14382.7 Da, que se corresponde, dentro del error experimental, con la masa molecular de la proteína codificada por el gen sintetizado químicamente (14378.7 Da).

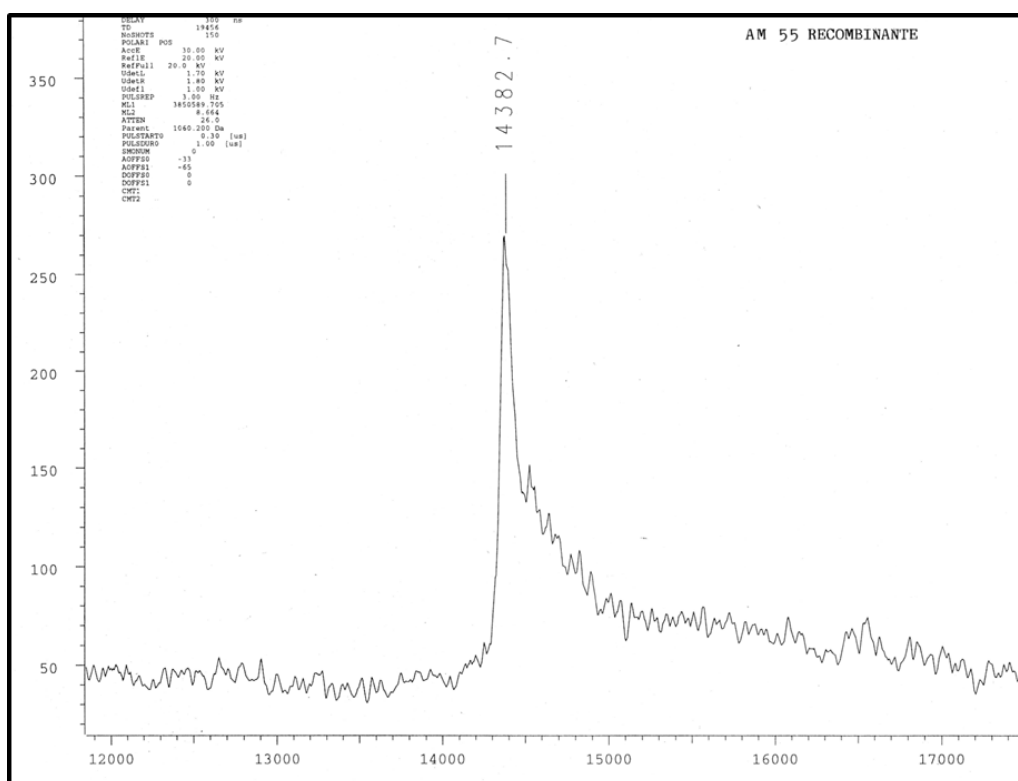


Figura 30. Registro de espectroscopia de masas de rAM.

4.5.2. Análisis de aminoácidos y degradación secuencial de Edman

Para evaluar la pureza de rAM55, así como la similitud con la proteína nativa se compararon las composiciones de aminoácidos de las dos proteínas obtenidas por hidrólisis ácida y análisis automático (tabla 7). Los datos experimentales obtenidos para rAM55 se ajustan perfectamente a los valores de la proteína purificada a partir de AM5. Las pequeñas diferencias existentes entre la proteína natural y la recombinante deben atribuirse a la microheterogeneidad de la proteína natural y a la presencia de la secuencia de conexión entre las dos subunidades en la proteína recombinante.

Por otro lado, la secuenciación del extremo amino terminal dio como resultado la siguiente secuencia: AEFMESKGER. Estos aminoácidos corresponden con los codificados por el gen construido para la proteína recombinante, lo que representa otro dato más a favor de la pureza de la muestra.

<i>Aminoácido</i>	<i>AM55</i>	<i>rAM55</i>
Ala	4.4	4.21
Arg	11.1	10.41
Asx	4.8	6.58
Cys*	4.2	3.1
Glx	31.5	33.15
Gly	7.5	7.81
His	1.2	0.81
Ile	3.2	2.36
Leu	4.5	3.8
Lys	3.5	2.7
Met	1.5	2.95
Phe	0	0.95
Pro	2.4	1.14
Ser	12.5	12.31
Thr	1.3	2.39
Trp	n.d.	n.d
Tyr	1.7	1.48
Val	4.7	3.87

Tabla 7. Composición de aminoácidos de AM55 y rAM55.

n.d.: aminoácido no detectable por el método empleado

* Cistina.

4.5.3. Dicroísmo circular

Para poder utilizar la proteína AM55 recombinante en los análisis conducentes a la determinación de su estructura tridimensional es necesario garantizar que mantiene el plegamiento característico de la proteína purificada a partir de las semillas de ricino. Con este fin, se ha obtenido el espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de rAM55y se ha comparado con el de AM55 natural. Como se observa en la figura 31, no existen diferencias entre ellos, no sólo en la forma sino también en los valores de elipticidad molar. En consecuencia, cabe concluir que los sistemas de oxidación de cisteínas y los de isomerización de cistinas del periplasma de *E. coli* han permitido que AM55 recombinante adquiera la estructura tridimensional de la proteína nativa.

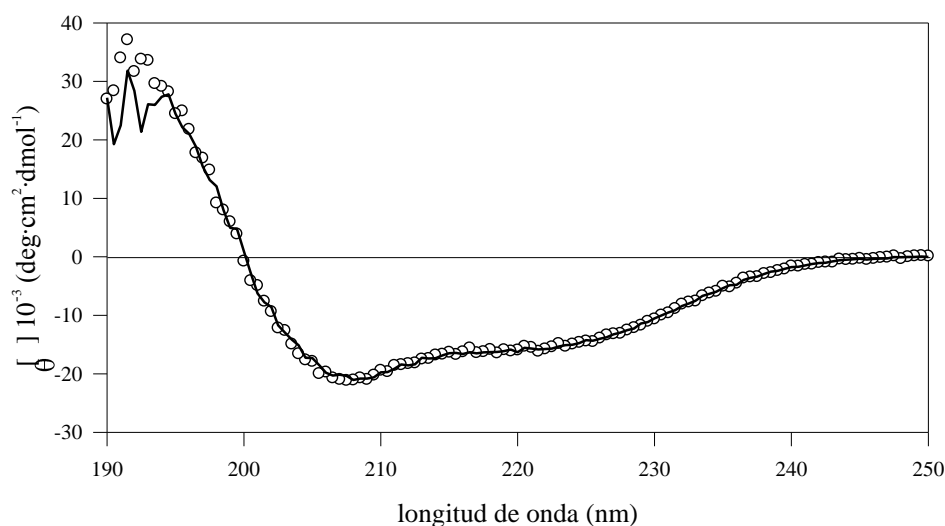


Figura 31. Espectro de dicroísmo circular ultravioleta lejano de AM55 natural (—) y AM55 recombinante (o)

4.5.4. Digestión con pepsina

Para comprobar que rAM55 mantenía la resistencia a la degradación gástrica de la proteína natural, se sometió a la acción digestiva de la pepsina a pH ácido. El análisis mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras evidenció que rAM55 permanece aparentemente intacta tras 6 horas de digestión, sin embargo, en presencia de DTT la banda de rAM55 aparece acompañada de otras dos bandas con velocidades de migración coincidentes con las de las cadenas (Fig. 32).

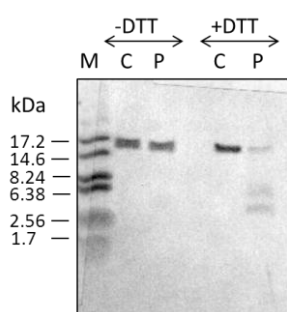


Figura 32. Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la resistencia a pepsina de rAM55. C, control sin proteasa; P, incubación con pepsina, 6 horas a 37 °C en ClH 10 mM, pH 2. Relación de proteasa:proteína (p/p) 1:25. M, patrones de masa molecular.

Con la intención de analizar el grado de integridad de la proteína digerida y valorar si mantenía el plegamiento nativo, se determinó su secuencia amino terminal y se registró su espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano. El resultado de la secuenciación permitió identificar una secuencia mayoritaria con los siguientes aminoácidos: MESK..... Esta secuencia corresponde a una forma más corta de la

proteína rAM55 a la que le faltan los tres primeros aminoácidos del amino terminal provenientes del procesamiento del péptido señal *ompA* que son los aminoácidos de más que contiene esta proteína respecto a la secuencia codificada por el gen. En el análisis también pudieron distinguirse otras dos secuencias cuyos primeros aminoácidos fueron los siguientes: VLR... y LRM... Estas dos secuencias son el producto del corte en los residuos 5 y 6, respectivamente, del péptido que mantiene unidas a las dos cadenas. Por esta razón el análisis electroforético en condiciones reductoras del producto resultante de la digestión permite separar las dos cadenas. Por otra parte, como se muestra en la figura 33, el espectro de dicroísmo de rAM55 no se modifica tras la digestión con pepsina, lo que representa una evidencia más a favor de la similitud estructural existente entre la proteína recombinante y AM55 natural.

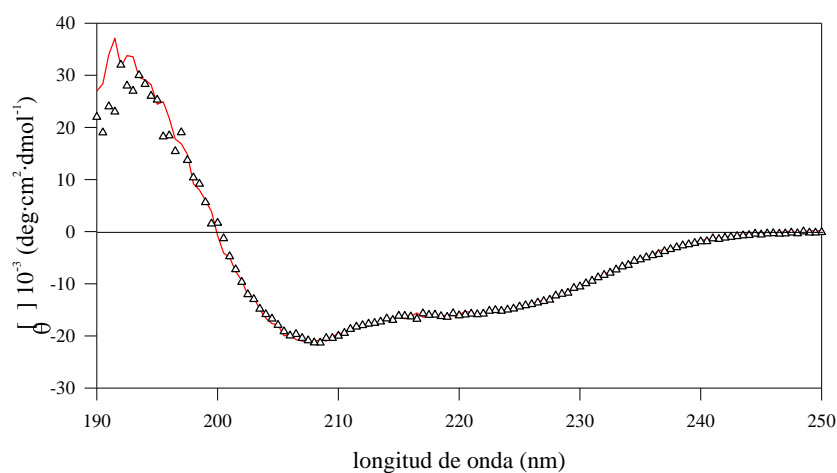


Figura 33. Espectro de dicroísmo circular ultravioleta lejano de rAM55 (---) y rAM55 digerida con pepsina (Δ).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento e identificación de los polipéptidos de AM5

Durante la primera etapa de este trabajo de experimentación, nuestro objetivo principal fue obtener preparaciones homogéneas de los distintos polipéptidos constituyentes del componente orgánico (AM5) del principio activo (AM3) de la especialidad farmacéutica Inmunoferon[®] para poder proceder a su identificación y caracterización molecular y a una ulterior síntesis de ellos mediante técnicas de biología molecular.

El análisis inicial de AM5 mediante SDS-PAGE reveló la existencia de tres únicas bandas con masa molecular aparente ~20, 7.4 y 5.2 kDa. Teniendo en cuenta la diferencia en masa molecular aparente de estas tres bandas y la masa media del componente polisacárido de AM5 (~150000 Da, resultados no mostrados obtenidos por ultracentrifugación analítica), nos pareció razonable comenzar la purificación con una cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superosa 12 con rango de fraccionamiento entre 1000-300000 Da. Con esta primera etapa cromatográfica se consiguió separar una fracción en que se concentraba la mayor parte de la absorbencia a 280 nm (característica de los amino ácidos aromáticos de las proteínas) en la que copurifican los tres polipéptidos (Figura 2A y 2C). A continuación se llevó a cabo una cromatografía en fase reversa, de alta eficiencia, utilizando una columna C18 que permitió purificar a homogeneidad electroforética tres polipéptidos que denominamos AM55, AM56 y AM57 (Figura 2B y 2C). El orden de elución sugiere que AM55 es el más polar de los tres y AM57 el más hidrofóbico, mostrando AM56 un carácter intermedio. El análisis mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de agentes reductores de los puentes disulfuro, puso en evidencia que AM55 y AM56 son heterodímeros formados por dos subunidades de tamaño 6.2 y 4.6 kDa, y, 5.2 y 3 kDa, respectivamente, unidas por puentes disulfuro. Sin embargo, el patrón electroforético de AM57 no se vio modificado bajo estas últimas condiciones, lo que indica la presencia de una única cadena polipeptídica cuya masa coincide con la de la subunidad de mayor peso de AM56. Hay que señalar que el tamaño aparente de AM55 (~20 kDa) resulta significativamente superior a la suma de la masa de sus subunidades (10.8 kDa), al

contrario de lo que ocurre en AM56 cuyo tamaño (7.4 kDa) es aproximadamente equivalente al de la suma de éstas (8.2 kDa). Hay que hacer notar que cuando AM55 se obtiene mediante técnicas de ingeniería genética su comportamiento en los análisis de SDS-PAGE, en ausencia de agentes reductores es equivalente al de AM56 (Fig. 28). Las diferencias de comportamiento podrían deberse a que en condiciones nativas AM55 forma un dímero de dímeros. Este tipo de asociación estaría ausente en el caso de la proteína sintética. Debe tenerse en cuenta que en el caso de la proteína recombinante las dos cadenas del dímero nativo se sintetizan como una sola cadena (tal como son codificadas en el gen del ricino), y que ésta no es procesada para dar el dímero, como ocurre en las semillas. Esta falta de procesamiento podría hacer que los dímeros perdieran la capacidad de formar dímeros de orden superior. La peculiar movilidad electroforética del AM55 nativo podría deberse también a que se purificara fuertemente ligado a algún componente no peptídico de AM5. La espectrometría de masas, no aporta datos que ayuden a resolver este dilema.

Por otra parte, una vez conocida la naturaleza heterodimérica de AM55 y AM56, surgió la necesidad de obtener preparaciones homogéneas de cada una de sus cadenas con las que poder llevar a cabo una caracterización físico química de estas proteínas lo más completa posible. Esto se consiguió mediante el tratamiento de la proteína (AM55 o AM56) con DTT para reducir los puentes disulfuro, seguido de una cromatografía en columna de fase reversa.

La disponibilidad de los tres polipéptidos que componen la fracción proteica de AM5 nos permitió llevar a cabo su identificación mediante el uso combinado de las técnicas de análisis de aminoácidos, secuenciación amino terminal y espectrometría de masas. Inicialmente, la composición de aminoácidos de AM55 y AM56 se introdujo en el banco de datos de Swiss-Prot y se analizó su homología con otras proteínas mediante el programa ACompIdent (Wilkins *et al.*, 1996) resultando que presentaban una identidad próxima al 100% con las proteínas de reserva del ricino de la familia de las albuminas 2S denominadas Ric c 3 (da Silva Jr. *et al.*, 1996, Bashir *et al.*, 1998) y Ric c 1 (Sharief & Li 1982), respectivamente. Este resultado se corroboró a través de una nueva búsqueda de homología llevada a cabo, esta vez, en el banco de datos

GenBank/EMBL (Altschul *et al.*, 1997), con la secuencia amino terminal de cada proteína determinada previamente mediante la degradación secuencial de Edman.

Por último, para completar la caracterización inicial de estos polipéptidos, se determinaron también las masas moleculares de AM55, AM56 y sus subunidades constituyentes mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

El espectro de AM56 reveló la existencia de cierto grado de heterogeneidad (Fig. 6A), pudiéndose diferenciar dos picos mayoritarios con masas de 11487.0 Da y 11126.9 Da, y otros dos minoritarios con masas de 11374.8 Da y 11284.0 Da, respectivamente. De estos cuatro picos, únicamente el último coincide, dentro del error experimental, con la masa molecular de la proteína calculada a partir de su secuencia aminoacídica (11281.63 Da). Los otros tres picos, corresponden a formas de la proteína con algún residuo de más (11487.0 y 11374.8 Da) o de menos (11126.9 Da) que, presumiblemente derivan del procesamiento proteolítico al que se ve sometido el polipéptido precursor de AM55 y AM56 en el cuerpo proteico vacuolar. El análisis conjunto de los espectros de las dos cadenas permite deducir, tras acudir a la secuencia del precursor y considerar los segmentos que son procesados (Fig. 34), la naturaleza de la heterogeneidad que exhibe AM56. Así, mientras que el espectro de la cadena pesada mostró un único pico con masa 7334.5 Da, en consonancia con la esperada (7332.26 Da), el espectro de la cadena ligera reveló la existencia de cuatro picos, dos mayoritarios con masas de 4161.5 Da y 3802.5 Da, y dos minoritarios con masas de 4045.9 Da y 3959.1 Da. De acuerdo con la masa de la cadena ligera deducida de su secuencia (3957.37 Da), el pico minoritario de 3959.1 Da correspondería a la cadena intacta. Por otro lado, el incremento de 204.13 Da que muestra el pico de 4161.5 Da respecto a la masa teórica esperada es consistente con la presencia adicional en el extremo carboxilo del dipéptido Ser-Asp (202.02 Da), procedente de la hidrólisis en el enlace peptídico inmediatamente posterior al residuo de Asp192 del precursor, correspondiente a la secuencia SDN que conecta las dos cadenas (Fig. 34). Asimismo, el corte en el enlace peptídico posterior a la Ser (87 Da) de esa misma secuencia daría lugar a la especie de masa 4045.9 Da. Por último, en el caso del pico de 3802.5 Da, la pérdida de 154.87 Da respecto a la cadena intacta concuerda con la carencia de la Arg (156.1 Da) carboxilo terminal. En definitiva, podemos concluir que las tres formas que

acompañan a la cadena ligera intacta son el resultado de tres cortes adicionales a los predichos durante el procesamiento del precursor, uno en cada uno de los enlaces peptídicos posteriores a los residuos de serina y aspártico de la secuencia SDN que conecta la cadena ligera con la pesada, y el tercero en el enlace entre los dos últimos residuos de arginina del extremo carboxilo.

Como podemos comprobar, el resultado de la suma de la masa de la cadena pesada con cada una de las cuatro masas obtenidas para la cadena ligera: 11496, 11380.4, 11293.6 y 11137 Da, se corresponde razonablemente bien con las masas recogidas en el espectro de la proteína intacta: 11487.0, 11374.8, 11284.0 y 11126.9 Da, respectivamente.

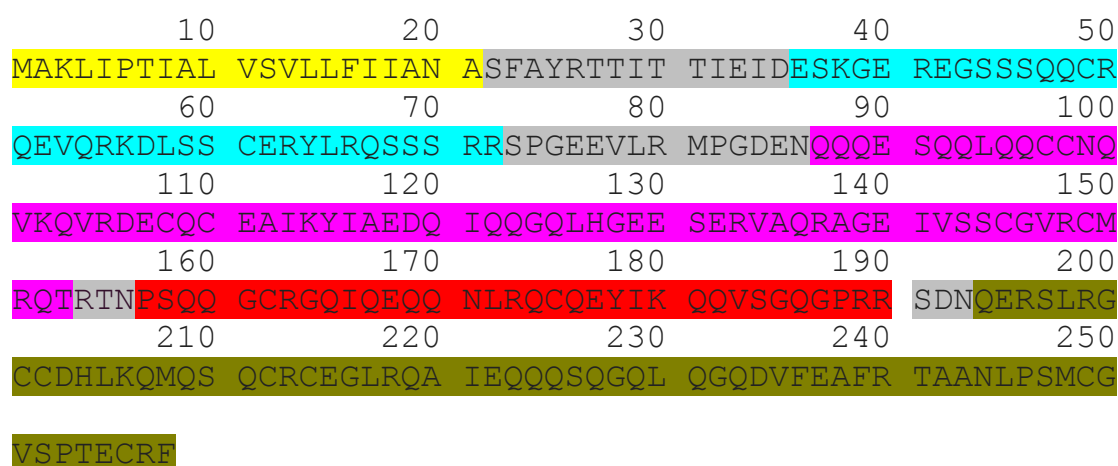


Fig 34. Secuencia aminoacídica del polipéptido precursor de las albuminas 2S de *Ricinus communis* (Irwin *et al.*, 1990). En amarillo se resalta el péptido señal y en gris los segmentos que son eliminados durante el procesamiento del precursor. Las cadenas constituyentes de AM55 se destacan en cian (ligera) y fucsia (pesada), y las de AM56 en rojo (ligera) y verde (pesada) (Bashir *et al.*, 1998).

El espectro de AM55 (Fig. 5) presentó dos picos mayoritarios con masa de 12367.3 y 12261.3 Da, lo que supone un incremento de 354.1 y 248.1 Da respecto a la masa molecular deducida de su secuencia aminoacídica (12013.19 Da), respectivamente. De nuevo, el análisis de los espectros de las dos cadenas ofrece información fundamental para descifrar el origen de la diferencia entre ambas masas. En

el caso de la cadena ligera la masa esperada es 4361.71 Da, sin embargo, se obtuvo un pico con un máximo a 4716 Da. El incremento de 354.29 Da se puede atribuir a la hidrólisis en el enlace peptídico posterior al Glu76 localizado en el segmento de conexión entre las dos cadenas (Fig. 33), lo que daría lugar a una forma con cuatro aminoácidos (SPGE) más en el extremo carboxilo, que aportan una masa de 370.14 Da. Por otro lado, en el espectro de la cadena pesada se diferenciaron dos picos mayoritarios con masas de 7655.1 Da y 7552.9 Da. El primero se ajusta notablemente bien con la masa esperada para la cadena intacta (7652.5 Da), mientras que en el segundo se detecta una pérdida de 99.6 Da respecto a dicha masa que podría deberse a la hidrólisis de la Thr (101.04 Da) carboxilo terminal.

El resultado de la suma de la masa de la cadena ligera con las dos masas obtenidas para la cadena pesada: 12371.1 y 12268.9 Da, daría cuenta de la existencia de las dos especies mayoritarias en el espectro de la proteína intacta: 12367.3 y 12261.3, respectivamente.

Nuestros resultados permiten concluir que las proteasas encargadas de procesar la proalbumina precursora para dar las proteínas maduras AM55 y AM56 no son totalmente específicas, pues los segmentos de conexión entre cadenas que, teóricamente deberían eliminarse durante dicho procesamiento, no son hidrolizados por completo, lo que da cuenta de la heterogeneidad que se detecta en estas proteínas. En el caso de AM56 hemos podido comprobar que dicha heterogeneidad reside únicamente en la cadena ligera, mientras que en AM55 la cadena pesada parece contribuir en mayor medida.

Aplicando la misma metodología utilizada con AM55 y AM56 al polipéptido minoritario AM57 pudimos establecer su identidad. El hecho de que su movilidad electroforética coincidiera con la de la cadena pesada de AM56 sugería que podía tratarse de la misma especie molecular. De hecho, la composición de aminoácidos resultó ser prácticamente idéntica para ambos polipéptidos, lo que supuso una primera evidencia a favor de esta hipótesis. Además, cuando se intentó determinar su secuencia amino terminal no se obtuvo ningún resultado, como cabía esperar si, efectivamente, se trataba de la cadena pesada de AM56, pues como ya hemos comentado esta tiene el extremo amino terminal bloqueado debido a la presencia de un residuo de

piroglutamina. Por último, el espectro de masas mostró un único pico de masa molecular 7330.29 Da, prácticamente coincidente con la masa establecida para la cadena pesada de AM56 (7334.5 Da). En conclusión, podemos afirmar que AM57 y la cadena pesada de AM56 son la misma especie molecular.

5.2. Estudio estructural de AM55 y AM56

El estudio de la estructura secundaria de AM55 y AM56, las dos proteínas mayoritarias que componen el Inmunoforon[®], se ha realizado mediante la técnica espectroscópica de CD. Las albuminas 2S de un elevado número de semillas han sido descritas en la bibliografía como proteínas con una estructura genérica secundaria predominante α -helicoidal (35-50%; Moreno & Clemente, 2008), denominada todo α . Este tipo de estructura se hace palmariamente evidente en los espectros de CD de AM55 y AM56 que llevamos a cabo. Concretamente la cuantificación de los diferentes elementos conformacionales de estructura secundaria para AM55 y AM56 dio como resultado un 59-62% de hélice α , un 3% de lámina β , un 11-12% de giros β y un 26-27% de estructura desordenada. La gran coincidencia entre las estimaciones obtenidas para ambas proteínas refleja la existencia de un plegamiento nativo aparentemente idéntico entre ambas. El contenido en hélice α de AM55 (48%) calculado a partir de los datos estructurales obtenidos por RMN (PDB: 1PSY) utilizando una preparación sintetizada a partir de los resultados que presentamos en esta tesis concuerda notablemente bien con la cuantificación establecida por CD. Las diferencias entre las estimaciones del contenido en hélice α determinado por CD y RMN pueden atribuirse a los pequeños errores cometidos en las estimaciones del contenido de estructura secundaria a partir de las medidas de CD en el UV lejano derivados de asumir valores promedio de dicroísmo para todas las estructuras secundarias de un mismo tipo y que no necesariamente tienen que ser idénticas para todas las proteínas, ya que las estructuras se encuentran en entornos diferentes en cada caso.

El análisis de los espectros de CD de las dos cadenas individuales que conforman AM55 y AM56 obtenidas tras la reducción de los grupos sulfidrilo reveló que estos polipéptidos carecen de elementos estructurales tipo nativo, lo que nos

permite concluir que el ensamblaje de ambas subunidades a través de los puentes disulfuro resulta fundamental para conseguir el plegamiento característico de la estructura nativa de estas proteínas.

La conformación nativa de una proteína, que está relacionada con su función biológica (Creighton, 1993), es debida a la participación y compensación de diferentes fuerzas: covalentes (puentes disulfuro); no covalentes (puentes de hidrógeno, las interacciones de van der Waals, las interacciones electrostáticas, efecto hidrofóbico (Dill, 1990). Nuestros resultados sugieren que en el caso de AM55 y AM56, los puentes disulfuro juegan un papel decisivo, pues en ausencia de estos estas proteínas parecen carecer de plegamiento estable.

Para caracterizar la estabilidad conformacional de AM55 y AM56 se analizaron los espectros de CD obtenidos tras el tratamiento con diferentes agentes desnaturalizantes como son urea, GnCl, temperatura y pH. Estos estudios por CD en el UV lejano mostraron que estas proteínas mantienen su estructura nativa prácticamente intacta en casi todas las condiciones experimentales utilizadas.

La desnaturalización química con urea 8 M y GnCl 4 M no produjo alteraciones significativas en los espectros nativos de AM55 y AM56, lo que refleja la existencia de una estructura sumamente robusta en que los puentes de hidrógeno no juegan un papel esencial. Únicamente en presencia de GnCl 8 M se consiguió alcanzar la pérdida completa de estructura secundaria. Es importante señalar que este proceso de desnaturalización es completamente reversible, puesto que cuando la concentración de GnCl 8 M se diluyó a la mitad, la proteína recuperó las propiedades espectroscópicas de dicroísmo propias de la estructura nativa sin necesidad de que mediara periodo de incubación alguno. Diversos trabajos en los que se utilizan pequeños péptidos modelo con estructura de hélice α han demostrado que a la misma concentración molar, el GnCl es dos veces más eficaz que la urea desnaturalizando este tipo de estructura regular (Gokhale *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos están en concordancia con estos datos, ya que como hemos referido previamente AM55 y AM56 poseen un alto contenido de hélice α . A la hora de analizar estos resultados debe tenerse también en consideración que el GnCl y la urea ejercen su efecto desnaturalizante de forma distinta: la urea destruyendo primordialmente los puentes de hidrógeno; el GnCl haciendo desaparecer

la estructura del agua que da lugar a la aparición de las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos (O'Brien *et al.*, 2007). El GnCl además es una sal. Por lo tanto, el GnCl en solución acuosa se encuentra totalmente disociado en sus correspondientes iones, Gn^+ y Cl^- , que se unirán a los grupos cargados de la proteína, suprimiendo así las interacciones electrostáticas en las que participan dichos grupos en la conformación nativa de la proteína (Monera *et al.*, 1994). Debe tenerse en cuenta que a pH neutro, AM55 posee 19 residuos cargados positivamente y 17 cargados negativamente, de un total de 107 aminoácidos, y AM56 13 residuos con carga positiva y 10 con carga negativa, de 99 totales. Lo que da cuenta de las numerosas interacciones de este tipo que potencialmente pueden tener lugar en estas proteínas.

En el caso de la desnaturalización por pH, AM55 y AM56 también presentaron un comportamiento muy similar. Tanto a pH ácido como básico el espectro de dicroísmo circular en el UV lejano sigue mostrando características propias de una proteína con predominio de hélice α , con mínimos en 208 y 222 nm y un máximo alrededor de 190 nm, sin encontrar cambios significativos en las propiedades estructurales secundarias con respecto a la proteína en condiciones nativas. Con el fin de confirmar estos resultados se calcularon los elementos estructurales de la proteína disuelta en las soluciones a pH 2 y 9 a través del uso del programa CONTINLL. Los resultados indicaron que todas las fracciones permanecen prácticamente constantes. El estudio de la desnaturalización por pH se completó analizando el efecto añadido de la temperatura. Aunque ambas proteínas, como otros miembros de la familia (Murtagh *et al.*, 2003; Pantoja-Uceda *et al.*, 2004a; Koppelman *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2005a; Moreno *et al.*, 2005b; Lehmann *et al.*, 2006; Tomar *et al.*, 2014a; Tomar *et al.*, 2014b; Pfeifer *et al.*, 2015), exhiben una elevada estabilidad a temperatura de 90°C, en el caso de AM55, el comportamiento a los dos pH ensayados fue algo distinto. Así, mientras que a pH básico se observó una pérdida de un 15% de la fracción de elementos estructurales helicoidales, a pH ácido la pérdida de hélice α ascendió al 45 %. No obstante, en ambos casos el proceso fue completamente reversible a temperatura ambiente. Resultados similares se han obtenido con otras albuminas 2S, tales como las de girasol (González-Pérez *et al.*, 2005), colza (Krzyzaniak *et al.*, 1998) o el alérgeno mayoritario de la nuez de Brasil Ber e 1 (Koppelman *et al.*, 2005). Estudios realizados mediante la técnica de calorimetría de barrido diferencial (DSC) también indican que

algunas albuminas 2S son menos estables frente a la temperatura a pH ácido (Moreno & Clemente, 2008). El hecho de que la estabilidad térmica varíe con el pH del medio en el que se encuentra la muestra puede deberse a un cambio de protonación en la proteína durante el proceso de desnaturalización. A pH 2 los grupos carboxilo de los residuos de aspártico, glutámico y del carbono α del extremo C-terminal pueden estar protonados. Por tanto, es posible que si estos grupos están involucrados en la formación de puentes salinos, la ruptura de los mismos como consecuencia de la falta de ionización de los grupos ácidos tenga una repercusión directa en la estabilidad global de la estructura nativa de la proteína.

5.3. Resistencia frente a digestión por proteasas

En la literatura se pueden encontrar numerosos casos de albúminas 2S resistentes a la hidrólisis enzimática, entre las que se incluyen las de cacahuete (Vissers *et al.*, 2011), mostaza (Sirvent *et al.*, 2012), nuez de Brasil (Moreno *et al.*, 2005; Murtagh *et al.*, 2003), sésamo (Orruno & Morgan, 2011), girasol (Murtagh *et al.*, 2003) y avellana (Pfeifer *et al.*, 2015). Se ha descrito que la gran resistencia que muestran estas proteínas frente a la digestión está directamente relacionada con su compacta estructura tridimensional estabilizada por el esqueleto conservado de puentes disulfuro (Gekko *et al.*, 2003; Vissers *et al.*, 2011; Rundqvist *et al.*, 2012). El hecho de que las nsLTPs, familia de proteínas perteneciente a la misma superfamilia (prolaminas) que las albuminas 2S y estructuralmente muy próximas a ellas, muestren también una gran resistencia a la digestión gastrointestinal (Asero *et al.*, 2000; Scheurer *et al.*, 2004) supone un argumento a favor de esta idea.

En este trabajo hemos analizado la susceptibilidad proteolítica de AM55 y AM56 frente a pepsina, tripsina y quimotripsina. Los ensayos de digestión *in vitro* demostraron que, efectivamente, ambas proteínas son muy resistentes frente a la acción digestiva de las tres proteasas, lo que sugiere que son capaces de atravesar el tubo digestivo sin sufrir notables modificaciones en su estructura.

La predicción de los potenciales puntos de corte de pepsina, tripsina y quimotripsina muestra que ambas proteínas poseen numerosos enlaces peptídicos susceptibles de ser hidrolizados distribuidos de forma prácticamente homogénea a lo largo de toda la secuencia (Fig. 35). Conviene mencionar, no obstante, que los puntos teóricos de corte para quimotripsina y pepsina, son menos numerosos en AM55 que en AM56. A la vista de estos datos, cabe suponer que la gran resistencia a la hidrólisis es reflejo de la inaccesibilidad de las proteasas a sus correspondientes dianas presentes en AM55 y AM56. En la actualidad es un hecho constatado y descrito en la literatura que para ejercer su acción proteolítica, las peptidasas requieren que la cadena polipeptídica a atacar sea accesible y posea un cierto grado de movilidad, pues de lo contrario la interacción con la misma se puede ver impedida parcial o totalmente (Fontana *et al.*, 1986). En concreto, se ha determinado que las aspartil peptidasas (e.g. pepsina) tienen la capacidad de interaccionar, de manera similar a las chaperonas, con regiones extendidas de la proteína carentes de estructuras regulares o muy poco plegadas (Hulko *et al.*, 2007). En la figura 35 se representan las regiones de alto nivel de empaquetamiento de AM55 que se observan en su estructura tridimensional (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003). Como se ve, una gran parte de los puntos teóricos de proteólisis por tripsina, quimiotripsina y pepsina quedan incluidos en estas regiones o en sus proximidades, lo que explica la alta resistencia de AM55 a la hidrólisis por estas proteasas. Dada la alta similitud con AM55 de la secuencia AM56 es de todo punto razonable asumir unas regiones equivalentes de alto empaquetamiento en ésta última que protegería también a los numerosos puntos teóricos de corte de ésta del ataque de las tres proteasas mencionadas más arriba.

La única forma de conseguir la hidrólisis completa fue reduciendo y alquilando previamente la proteína o en presencia de termolisina a 70°C. Estos resultados corroboran que la resistencia que muestran AM55 y AM56 a la digestibilidad por las enzimas gastrointestinales se puede atribuir a la estructura tridimensional extraordinariamente compacta y rígida sostenida por el esqueleto de puentes disulfuro.

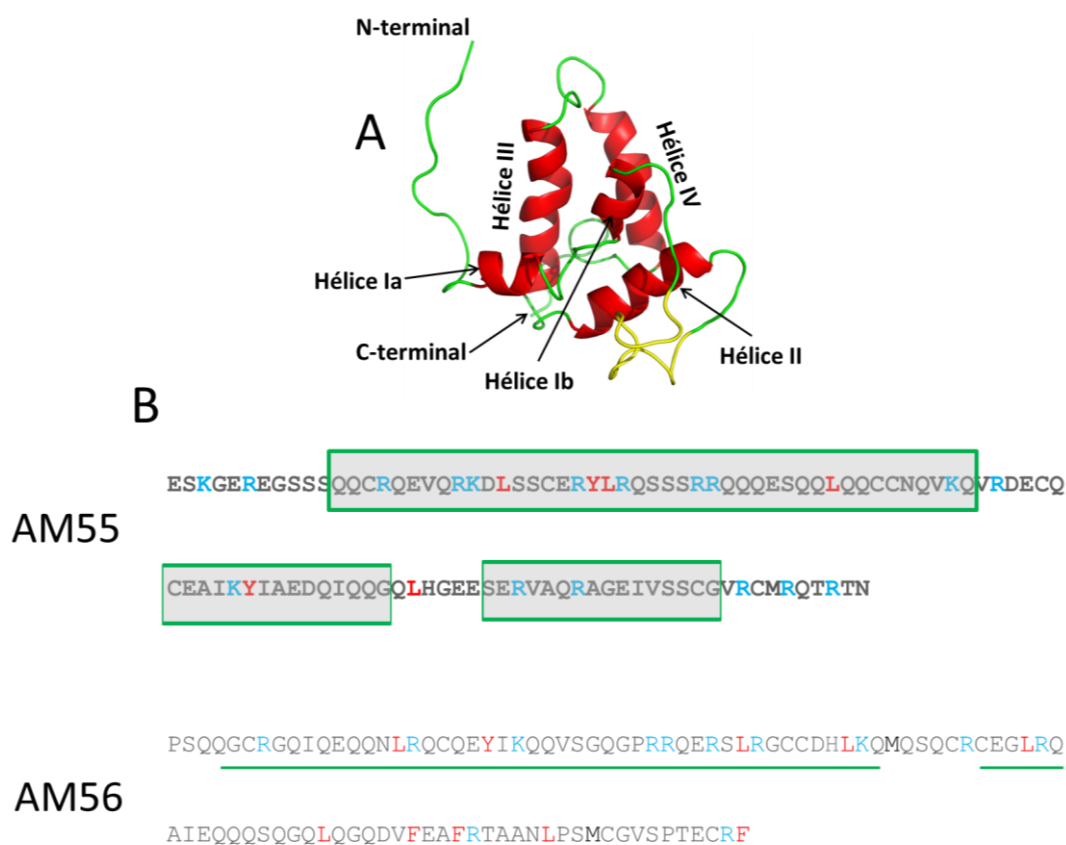


Figura 35. A) Representación gráfica de la estructura de rAM55 descrita por Pantoja-Uceda *et al.* En amarillo se destaca el péptido que conecta las dos cadenas, ausente en la proteína nativa. B) Secuencia de AM55 y AM56 con los sitios predictivos de corte de pepsina y quimotripsina (residuos en rojo) y tripsina (residuos en cian). Las cajas grises representan las regiones de alto nivel de empaquetamiento correspondientes a las cinco hélices α (Ia, Ib, II, III y IV) de rAM55. Las presuntas regiones altamente empaquetadas de AM56 aparecen como líneas verdes continuas bajo su secuencia.

Con esta parte del estudio se concluye que las propiedades estructurales de AM55 y AM56 son muy similares. Ambas son proteínas muy estables frente a las proteasas, los agentes químicos, el pH y la temperatura *in vitro*. La base de dicha estabilidad reside en las propiedades singulares de su estructura terciaria y explicaría la capacidad de Inmunoferon[®] para ejercer su acción farmacológica tras la administración por vía oral.

5.4. Expresión de AM55 en *E.coli*

Durante esta fase del trabajo, nuestro principal objetivo fue conseguir un sistema de sobreexpresión que nos permitiese obtener una forma recombinante de AM55 molecularmente homogénea, con propiedades estructurales equivalentes a las de la proteína natural y etiquetada isotópicamente para poder llevar a cabo su estudio estructural por RMN. Por otra parte, y aunque se aleja del interés central de esta tesis, no cabe duda de que, dado el carácter alergénico de AM55 (Youle & Huang., 1978), la disponibilidad de la proteína perfectamente definida a nivel molecular también aporta una herramienta esencial para posibilitar su caracterización inmunológica.

AM55 posee ocho residuos de cisteína dispuestos según el patrón conservado característico de la familia de las albuminas 2S. El apareamiento apropiado de dichas cisteínas resulta esencial para asegurar la formación de los cuatro puentes disulfuro (dos intercatenarios y dos intramoleculares en la cadena pesada) que mantienen la estructura nativa, lo que sin duda supone una primera dificultad a la hora de conseguir producir la proteína recombinante. Un problema adicional cuando se expresan proteínas heterólogas en *E.coli* radica en las diferencias existentes entre los organismos eucarióticos y procarióticos en la frecuencia de uso de codones (Kane, 1995). A este respecto, el gen natural de AM55 contiene un número significativo de codones, especialmente de arginina, con baja frecuencia de uso en *E.coli*, lo que puede conducir a una expresión ineficiente.

Dado que la secuencia de aminoácidos de AM55 es conocida y su tamaño es relativamente pequeño, la estrategia utilizada consistió en expresar la secuencia continua de nucleótidos sintetizada químicamente, que codifica ambas cadenas, unidas por el segmento peptídico que es procesado *in vivo* durante la maduración de la semilla y cuya presencia resulta fundamental para que la proteína consiga la estructura tridimensional correcta (D'Hondt *et al.*, 1993). Esta estrategia permite sustituir aquellos codones de poco uso en *E.coli*, por otros de mayor uso, mitigando de esta manera los problemas derivados de esta circunstancia.

Cabía esperar que la proteína recombinante fuera estructuralmente equivalente a la proteína nativa, ya que el plegamiento de la proalbumina precursora *in vivo* es previo

al procesamiento proteolítico que elimina el segmento que conecta ambas cadenas para dar la proteína madura (Otegui *et al.*, 2006).

Con el fin de expresar la proteína recombinante en *E.coli*, se realizaron diversas construcciones utilizando el gen sintético. En primer lugar, se intentó llevar a cabo la expresión directa de rAM55 en el citoplasma de *E. coli*, utilizando para ello el vector pHAT2. Este vector incluye una secuencia de seis histidinas que permite la fusión de la región codificante de la proteína a continuación de dicha secuencia para facilitar su purificación. Con este sistema de expresión, el crecimiento celular se detuvo prácticamente por completo, no se obtuvo producto detectable mediante SDS-PAGE, y únicamente la transferencia “Western” reveló que sí hubo en realidad una mínima acumulación de la proteína recombinante de forma insoluble, posiblemente formando parte de cuerpos de inclusión. Estos datos parecen indicar que la expresión de rAM55 conlleva toxicidad para *E. coli*. Esta toxicidad se traduce en la inhibición del crecimiento y la casi nula acumulación de la proteína recombinante. Puesto que los cuerpos de inclusión carecen de actividad biológica, sólo cuando la proteína sintetizada se deposita en estos agregados proteicos deja de ser tóxica y las células son capaces de sobrevivir. Aparentemente esta es la explicación del escaso número de colonias recombinantes encontrado en las placas de expresión con el vector pHAT2-3C-AM55.

Es bien conocida la importancia que tiene la temperatura para controlar y ralentizar el metabolismo de la bacteria favoreciendo la solubilidad de la proteína expresada (Schein *et al.*, 1988; Sorensen *et al.*, 2005). Para descartar que el bajo nivel de expresión estuviera relacionado con este parámetro se llevó a cabo la expresión a varias temperaturas comprendidas entre 25°C y 37°C (resultados no mostrados). También se probaron distintas concentraciones de inductor y tiempos de inducción. En ningún caso, ni el rendimiento, ni la solubilidad de la proteína recombinante aumentaron de modo apreciable respecto a las condiciones descritas en el apartado “Resultados”.

En el citoplasma de *E. coli*, los residuos de cisteína se mantienen reducidos mediante dos sistemas, el de tioredoxina/tioredoxina reductasa y el de glutaredoxina/glutaredoxina reductasa (Stewart *et al.*, 1998). Esto ocasiona con frecuencia que las proteínas eucarióticas con puentes disulfuro en su estado nativo se

sinteticen desnaturalizadas en forma de cuerpos de inclusión insolubles, y por ende, sin actividad biológica (Hartley and Kane., 1988; Georgiou *et al.*, 1996). Bajo este escenario, la insolubilidad de rAM55, seguramente se debe a la dificultad para formar correctamente los cuatro puentes disulfuro que posee la proteína nativa.

En algunas ocasiones, si la proteína expresada se acumula altamente concentrada en cuerpos de inclusión, es posible recuperar la conformación nativa si estas estructuras se disgregan y se evita la formación de nuevos agregados. Mediante esta aproximación experimental se han producido en *E. coli* las albuminas 2S recombinantes de cacahuete PSC33 (Clement *et al.*, 2005) y Ara h 6 (Hazebrouck *et al.*, 2012), así como la napina de melón amargo (*Momordica charantia*) Mcnapin (Vashishta *et al.*, 2006). En este último trabajo se pone de manifiesto que rMcnapin, una vez renaturalizada, mantiene el 90% de la actividad antifúngica presente en la proteína natural, lo que representa una prueba evidente de la efectividad del método empleado para la obtención de la albumina recombinante en su conformación nativa. Merece la pena señalar que la expresión en cuerpos de inclusión, pese a las dificultades que presenta para obtener un producto homogéneo válido para estudios estructurales de alta resolución, posee la ventaja de facilitar la producción de proteínas que puedan resultar tóxicas para la bacteria, por lo que bajo esta perspectiva, podría haber sido una opción aplicable a la producción de AM55. Sin embargo, cualquier intento de mejorar el rendimiento de la expresión en cuerpos de inclusión para AM55 insertada en el plásmido pHAT2 fue completamente imposible.

Hasta la fecha, además de las ya mencionadas, se ha conseguido sintetizar en *E. coli* varias albuminas recombinantes más de distintas especies de plantas, como la mostaza amarilla (González de la Peña *et al.*, 1996), el nogal (Teuber *et al.*, 1998), el cacahuete (Lehmann *et al.*, 2003), el anacardo (Robotham *et al.*, 2005) o el alforfón (Choi *et al.*, 2007). La estrategia común utilizada en todos estos casos para intentar obtener un producto soluble consistió en recurrir a la expresión como proteína de fusión a un polipéptido acompañante altamente soluble (GST, tioredoxina o MBP). El mejor resultado se alcanzó con el alérgeno de cacahuete Ara h 2 fusionado a tioredoxina y expresado en *E. coli* Origami (DE3), una cepa deficiente para tioredoxina y glutaredoxina reductasa que facilita la formación de puentes disulfuro en el citoplasma

celular. Aun así, aproximadamente el 50% de la proteína de fusión se depositaba en cuerpos de inclusión (Lehmann *et al.*, 2003). En los demás casos, la mayoría de la proteína expresada permanecía insoluble por lo que los rendimientos de purificación fueron bastante bajos. Por otra parte, para poder llevar a cabo estudios dirigidos a resolver la estructura de la albumina fusionada, previamente será necesario eliminar la etiqueta de fusión. Esto supone, en primer lugar, tratar la proteína de fusión, una vez purificada, con una proteasa cuya especificidad y eficiencia de corte pueden ser muy variables (Arnau *et al.*, 2006; Waugh., 2011), y, en segundo lugar, un paso de purificación adicional que facilite la separación de la albumina recombinante liberada, del polipéptido fusionado y de la proteasa. Por tanto, conseguir proteína en cantidad y calidad suficiente para la realización de estudios estructurales mediante este procedimiento, en ocasiones, puede resultar una tarea complicada o incluso imposible de alcanzar.

Considerando las limitaciones que exhiben las distintas estrategias mencionadas a la hora de expresar albuminas 2S en *E. coli*, optamos por recurrir a otra conocida alternativa experimental, que hasta entonces no había sido aplicada con éxito en estas proteínas, consistente en utilizar sistemas en los que la síntesis de la proteína va acoplada a su secreción al espacio periplásmico. El espacio periplásmico proporciona el ambiente oxidante requerido para la formación de puentes disulfuro gracias a la presencia de las enzimas que catalizan la oxidación de cisteínas y la isomerización de cistinas (Kadokura *et al.*, 2003; Messens & Collet., 2006). Además, la producción de la proteína recombinante en el periplasma conlleva otras ventajas, entre las que cabe destacar: la actividad proteolítica es mucho menor que en el citoplasma (Talmadge & Gilbert., 1982; Swamy & Goldberg., 1982), la toxicidad disminuye notablemente y se simplifica la purificación puesto que las proteínas periplásmicas tan sólo representan el 4% del contenido proteico celular total (Choi *et al.*, 2006; Sroga & Dordick., 2002).

El paso de una proteína desde el citoplasma hasta el periplasma a través de la membrana plasmática requiere de la intervención de un péptido señal. En la literatura existen numerosos trabajos en los que se utilizan vectores de secreción que contienen secuencias señal de proteínas de *E. coli*, como *phoA* (Denèfle *et al.*, 1989), *ompA* (Ghrayeb *et al.*, 1984), *ompT* (Johnson *et al.*, 1996), *lamB* y *ompF* (Hoffman &

Wright., 1985), etc. La señal de secreción empleada en la translocación de rAM55 corresponde a la proteína de membrana externa *ompA* y va incorporada en los vectores de expresión periplásmica de la serie pIN-III (Ghrayeb *et al.*, 1984). En concreto, para conseguir la expresión en el periplasma se ha insertado el gen codificante para AM55 en el vector pIN-III-*ompA*-2. La expresión en medio rico (LB) de rAM55 fusionado al péptido señal de la proteína *ompA* produjo la acumulación en el periplasma de un polipéptido soluble del tamaño esperado (14.4 kDa) y con tres aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal respecto a la secuencia del gen, como cabía esperar tras el correcto procesamiento del péptido señal. Por otro lado, la viabilidad de las células en absoluto se ve comprometida por la acumulación de rAM55. Estos resultados indican que la expresión de rAM55 en el periplasma no resulta tóxica para *E. coli*, al contrario de lo que ocurre cuando ésta tiene lugar en el citoplasma. Además, este sistema presenta la ventaja adicional de que el destino final para la mayor parte de la proteína producida acaba siendo el medio de cultivo extracelular, lo que facilita enormemente su purificación a partir del sobrenadante del cultivo. La presencia de rAM55 en el medio de cultivo no es un hecho sorprendente, pues la pérdida de proteína recombinante desde el espacio periplásmico hacia el medio extracelular asociada al uso de este tipo de sistemas ha sido descrita en múltiples ocasiones (Molina *et al.*, 1992; Slos *et al.*, 1994; Kipryanov *et al.*, 1997). Se desconoce cuál es el mecanismo responsable de este fenómeno, pero probablemente la proteína recombinante es liberada al medio de cultivo pasivamente, y no por una verdadera secreción, cuando la membrana celular externa se desestabiliza como resultado del envejecimiento celular o debido a cambios en las condiciones de cultivo (Stader & Silhavy, 1990).

Conseguir la expresión en medio rico suponía un primer paso obligado, sin embargo, como se comentó antes, nuestro objetivo final era obtener proteína nativa marcada isotópicamente a escala preparativa con el fin de abordar la resolución estructural por RMN. La incorporación de los isótopos de interés (^{15}N y/o ^{13}C) a la proteína recombinante durante su expresión exige que *E. coli* sea capaz de crecer en un medio pobre en nutrientes (medio mínimo M9) con una única fuente de nitrógeno y otra de carbono (Rozkov *et al.*, 2006). Es bien sabido que en esta situación el crecimiento de *E. coli* es muy lento y esto hace que se reduzcan los niveles de expresión de las proteínas entre 2 y 4 veces con respecto a los que se logran en medio rico (Marley *et al.*, 2001).

Sin embargo, cuando se intentó expresar rAM55 en medio mínimo, lejos de alcanzar niveles en el rango señalado, el rendimiento de la expresión resultó ser insignificante. Ha sido descrito que la eficacia del sistema de secreción *ompA* está directamente relacionada con el medio de cultivo empleado para llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante, disminuyendo considerablemente cuando ésta transcurre en medios pobres (Denèfle *et al.*, 1989). De acuerdo con este dato, cuando rAM55 se expresa en medio mínimo, no puede secretarse eficientemente y acaba acumulándose de nuevo en el citoplasma provocando la muerte de las bacterias, lo que explicaría el bajo nivel de expresión detectado bajo estas condiciones. De hecho, al suplementar el medio mínimo con casaminoácidos, se consiguen niveles de expresión de rAM55 incluso superiores a los alcanzados con medio LB, lo que indica que en estas condiciones de crecimiento el sistema *ompA* se encuentra plenamente operativo y confirma que, efectivamente, la eficacia de la translocación de rAM55 depende del medio de cultivo utilizado.

La búsqueda de una solución que nos permitiera conseguir sobreexpresar rAM55 en medio mínimo nos condujo a considerar una alternativa metodológica, desarrollada por Miroux y Walker hace dos décadas (Miroux & Walker, 1996), dirigida a superar las dificultades que presenta la expresión de proteínas tóxicas, consistente en la selección empírica de cepas con mutaciones genómicas que mejoran la expresión de la estirpe original de la que derivan. Concretamente, estos autores aislaron las conocidas cepas C41(DE3) y C43(DE3), derivadas de *E.coli* BL21(DE3), por su fenotipo resistente a la expresión de proteínas tóxicas de membrana. Basándonos en dicha estrategia, se desarrolló el procedimiento de selección en medio mínimo de mutantes que confieren tolerancia a la toxicidad de rAM55 expuesto en el apartado “Resultados”. Dicho procedimiento dio lugar al aislamiento de la cepa supersecretora denominada BL21-SS a partir de *E.coli* BL21 transformada con el vector pINompA-AM55. Los resultados obtenidos de los experimentos de expresión evidenciaron que la nueva cepa tiene la capacidad de crecer en medio mínimo, con amonio como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono, y simultáneamente sobreproducir rAM55 y secretarla al medio de cultivo en forma soluble, evitando así la muerte celular que acarrea su acumulación en el citoplasma. Cabe suponer que una de las adaptaciones genéticas que confieren el fenotipo supersecretor a la cepa BL21-SS afecta al sistema *ompA*, pues este no solo

recupera la capacidad translocadora inicialmente ausente en medio mínimo sino que supera la que exhibía en la cepa original cultivada en medio rico.

Por otra parte, para poder utilizar la nueva cepa con garantía de éxito ha sido necesario asegurarse de que ésta presenta la suficiente estabilidad como para mantener las características secretoras. Para demostrar que esto es así, las cepas se han curado con dosis subletales de novobiocina y posteriormente se han retransformado con el vector pINompA-AM55, comprobándose que la producción de proteína antes y después de curar es equivalente.

5.5. Expresión de la proteína etiquetada con ^{15}N

Para la obtención de la proteína marcada con ^{15}N , el protocolo general de expresión establecido para medio rico se modificó ligeramente optimizando la cantidad final de cloruro amónico marcado en el cultivo con el fin de alcanzar los mayores niveles de expresión al menor coste posible. Con este protocolo se pudo obtener la proteína etiquetada con ^{15}N como producto de secreción en el medio de cultivo, lo que permitió su purificación hasta homogeneidad a partir del sobrenadante del cultivo celular. Esta se ha llevado a cabo en cuatro etapas, dos que incluían el fraccionamiento por precipitación, primero con calor y después con etanol, una cromatografía de intercambio aniónico y otra de intercambio catiónico. El fraccionamiento con calor se realiza desechando las proteínas contaminantes que precipitan a 90°C, pues, rAM55 es estable a esta temperatura y permanece en solución. El fraccionamiento con etanol se lleva a cabo recogiendo las proteínas que precipitan al 80%, lo que supone recuperar la totalidad de rAM55 y eliminar compuestos no proteicos que pueden interferir en las etapas cromatográficas siguientes. La cromatografía de intercambio aniónico permite separar rAM55, que se recupera en el lavado de la columna, de la mayoría de las proteínas procedentes de la etapa anterior que son retenidas. A partir de aquí y a través de una etapa de intercambio catiónico en sulfo propil sepharosa, rAM55 fue finalmente purificada a homogeneidad electroforética. Al final del proceso de purificación se obtuvo un rendimiento de ~20 mg de proteína por litro de cultivo inducido en medio mínimo M9.

La identidad de rAM55 ha sido completamente confirmada mediante su caracterización molecular. La secuencia amino terminal, la composición de aminoácidos y la masa molecular de la proteína recombinante coincidieron con las deducidas a partir de la secuencia del gen construido. Asimismo, mediante el análisis comparativo de los espectros de CD de rAM55 y de la proteína natural se confirmó que ambas tienen un plegamiento virtualmente idéntico, sugiriendo que, ni el segmento peptídico adicional que une a las dos cadenas, ni los tres aminoácidos extra del extremo amino terminal, (ausentes en la proteína madura) interfieren de forma significativa en el plegamiento global. Además, rAM55 también presentó una gran resistencia a la acción proteolítica de la pepsina, pues, tras 6 horas de digestión en condiciones óptimas, tan sólo sufrió tres cortes, dos localizados en la secuencia de conexión entre las dos cadenas, y el tercero, en la F de la secuencia amino terminal AEF procedente del péptido señal *ompA*. Este resultado permite afirmar que el comportamiento de rAM55 es prácticamente indistinguible del que muestra la proteína nativa, ya que la pepsina únicamente es capaz de ejercer su acción proteolítica en los dos fragmentos peptídicos que la proteína recombinante posee de más respecto a la proteína nativa. Ambos segmentos se localizan en zonas de la estructura tridimensional de rAM55 carentes de estructura y expuestas al solvente, lo cual explicaría la accesibilidad de la proteasa. Como cabía esperar, el análisis espectroscópico de rAM55 tras la digestión con pepsina mostró que la estructura secundaria permanecía invariable. La gran resistencia a pepsina junto con la semejanza de los espectros de CD correspondientes a la proteína antes y después de ser digerida, corrobora que rAM55 posee una estructura muy estable y prácticamente idéntica a la de la proteína nativa.

Se puede concluir, por tanto, la validez de la estrategia experimental utilizada, consistente en expresar AM55 recombinante en el periplasma con la nueva cepa supersecretora portadora de la construcción pINompA-AM55, ya que no sólo los sistemas de oxidación de cisteínas y los de isomerización de cistinas han permitido que rAM55 adquiriera la estructura tridimensional propia de la proteína nativa, sino que, además, se ha conseguido producir proteína etiquetada con ^{15}N en cantidad y calidad suficientes como para determinar la estructura tridimensional por RMN.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 1- El componente proteico de la especialidad *Immunoferon*[®] está constituido por tres polipéptidos de 12.3, 11.4 y 7.3 kDa, que denominamos AM55, AM56 y AM57, respectivamente.
- 2- AM55 y AM56 son heterodímeros que constan de dos subunidades de distinta longitud unidas por puentes disulfuro. AM 57 está formado por una única cadena polipeptídica.
- 3- AM55 y AM56 son las proteínas de reserva del ricino de la familia de las albuminas 2S, Ric c3 y Ric c1, respectivamente. AM57 es la cadena pesada de AM56.
- 4- AM55 y AM56 presentan heterogeneidad derivada del procesamiento inespecífico del polipéptido precursor común.
- 5- La estructura secundaria de AM55 y AM56, registrada por CD en el UV lejano, es virtualmente idéntica, y consiste en: 62-59% de hélice α , 3% de lámina β , 12-11% de giros β y 27-26% de estructura desordenada.
- 6- La estructura secundaria de las subunidades que conforman AM55 y AM56 carece de elementos estructurales tipo nativo. Sugiriendo que los puentes disulfuro son esenciales para mantener la estructura nativa de estas proteínas.
- 7- AM55 y AM56 son proteínas estables frente a la desnaturalización inducida por agentes químicos, temperatura y pH. Su estructura nativa prácticamente no se altera en presencia de urea 8 M o GnCl 4 M; cuando el pH se baja a 2, o se sube a 9; o cuando la temperatura se incrementa hasta 90°C. La desnaturalización completa, aunque reversible, únicamente se consigue con GnCl 8 M.
- 8- AM55 y AM56 también son resistentes a la hidrólisis con pepsina, tripsina o quimotripsina. Solamente han podido hidrolizarse a 70 °C con termolisina. Estos resultados sugieren que estas proteínas atraviesan el tubo digestivo sin sufrir alteraciones significativas en su estructura nativa.

- 9- La expresión intracelular de AM55 conlleva toxicidad para *E. coli* que se traduce en inhibición del crecimiento y una mínima expresión de la proteína recombinante en la fase insoluble, probablemente en cuerpos de inclusión.
- 10- Se ha conseguido sobreexpresar AM55 en medio rico utilizando sistemas de expresión periplasmática basados en vectores de la serie pIN-III, así como cepas de *E.coli* BL21. La proteína recombinante obtenida es secretada mayoritariamente al medio extracelular por *E. coli*. Sin embargo, la expresión en medio mínimo con este sistema no fue posible debido a la toxicidad provocada por la acumulación intracelular de AM55.
- 11- Se ha aislado la nueva cepa supersecretora BL21-SS capaz de crecer en medio mínimo, con una única fuente de nitrógeno y de carbono, y simultáneamente sobreproducir la proteína recombinante y secretarla al medio de cultivo.
- 12- Se ha producido la proteína AM55 etiquetada con ^{15}N , en la cepa supersecretora BL21-SS. La proteína se ha purificado a partir del medio extracelular mediante dos etapas de precipitación y dos etapas cromatográficas, con un alto rendimiento (20 mg de rAM55 purificada por litro de cultivo celular). Se ha realizado la caracterización molecular y estructural de la proteína recombinante, demostrándose su equivalencia con la proteína natural. La obtención de la proteína etiquetada ha hecho posible la resolución de su estructura tridimensional por RMN.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. 5ª edición, McGraw-Hill- Interamericana.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, A., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25** (17), 3389-402.

Alvarez-Mon, M., Miravittles, M., Morera, J., Callol, L., Alvarez-Sala, J.L. (2005). Treatment with the immunomodulator AM3 improves the health-related quality of life of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest*. **127**, 1212-1218.

Antony, G.K., Dudek, A.Z. Interleukin 2 in cancer therapy. (2010). *Curr Med Chem.* **29**, 3297-3302.

Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **48**, 1–13.

Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., de Vries, S.C., Gautier, M.F., Ciurana, C.L., Verbeek, E., Mohammadi, T., Knul-Brettlova, V., Akkerdaas, J.H., Bulder, I., Aalberse, R.C., van Ree, R. (2000). Lipid transfer protein: a panallergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol.* **122**, 20-32.

Barasoain, I., Rejas, M.T., Arambaru, J. (1989). Inmunoforon enhances IL-1 production and restores the phagocytic activity of macrophages in immunodepressed animals. Proc XII Cong Nal Microbiol, Abstract 37.

Barber, L.D., and Parham, P. (1993). Peptide binding to major histocompatibility complex molecules. *Ann. Rev. Cell Biology.* **9**, 163-206.

Barker, W.C., Ketcham, L.K., Dayhoff, M.O. (1978). A comprehensive examination of protein sequences for evidence of internal gene duplication. *J Mol Evol.* **10**, 265-281.

Bashir, M.E., Hubatsch, I., Leinenbach, H.P., Zeppezauer, M., Panzani, R.C., Hussein, I.H. (1998). Ric c 1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: complete primary structures and phylogenetic relationships. *Int Arch Allergy Immunol.* **115**, 73-82.

Brieva, A., Guerrero, A., Pivel, J.P. (2002). Immunoferon, a glycoconjugate of natural origin, regulates the liver response to inflammation and inhibits TNF- α production by an HPA axis-dependent mechanism. *Int Immunopharmacol.* **2**, 807-813.

Clark, S.C., Kamen, R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science*, **236**, 1229-1237.

Camerota, G., Zubiani, G., Di Proietto, M.C. (1984). Empleo de un fármaco inmunoestimulante en la terapia de la tuberculosis pulmonar. *Infectología.* **5**, 294-299.

Cañavate, M.L., Pontón, J., Amurrio, C., Regulez, P., Cañada, J.L., Saura, A., Cisterna Cáncer, R.I. (1984). Efecto de un nuevo inmunomodulador sobre la funcionalidad de macrófagos de ratón. *Rev Clin Esp.* **3**, 159-162.

Chatenoud, L., Waldmann, H. (2012). CD3 monoclonal antibodies: a first step towards operational immune tolerance in the clinic. *Rev Diabet Stud.* **9**, 372-381.

Choi, S.Y., Sohn, J.H., Lee, Y.W., Lee, E.K. *et al.*, Application of the 16-kDa buckwheat 2S storage albumin protein for diagnosis of clinical reactivity. (2007). *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **99**, 254-260.

Clement, G., Boquet, D., Mondoulet, L., Lamourette, P., Bernard, H., Wal, J.M. Expression in *Escherichia coli* and disulfide bridge mapping of PSC33, an allergenic 2S albumin from peanut. (2005). *Protein Expr Purif.* **44** (2), 110-120.

- Cosio, M.G., Majo, J., Cosio, M. (2002). Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: Role of T cells. *Chest*, **121**(5 Suppl), 160S-165S.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., Avrameas, S. (1995). Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol.* **7**, 812-8.
- Creighton, T.E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed.; W. H. Freeman: New York, NY, USA.
- Daifotis, A.G., Koenig, S., Chatenoud, L., Herold, K.C. (2013). Anti-CD3 clinical trials in type 1 diabetes mellitus. *Clin Immunol.* **149**, 268-78.
- Danchin, A. & Henaut, A. (1997). The map of the cell is in the chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 852-4.
- da Silva, J.G. Jr, Machado, O.L., Izumi, C., Padovan, J.C., Chait, B.T., Mirza, U.A., Greene, L.J. (1996). Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. *Arch Biochem Biophys.* **336** (1), 10-8.
- Davidson, A., Diamond, B. Autoimmune diseases. (2001). *N Engl J Med.* **345**, 340-350.
- Delves, P.J. and Roitt, I.M. (2000). The immune system. *New Engl J Med.* **343**, 37-49.
- Denèfle, P., Kovarik, S., Ciora, T., Gosselet, N., Bénichou, J.C., Latta, M., Guinet, F., Ryter, A., Mayaux, J.F. (1989). Heterologous protein export in *Escherichia coli*: influence of bacterial signal peptides on the export of human interleukin 1 beta. *Gene.* **28**, 499-510.
- Di Donato, A., de Nigris, M., Russo, N., Di Biase, S. & D'Alessio, G. (1993). A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **212**, 291-3.

Dill, K.A., (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*. **29**, 7133–7155.

D'Hondt, K., Van Damme, J., Van Den Bossche, C., Leejeerajumnean, S., De Rycke, R., Derksen, J., Vandekerckhove, J., Krebbers, E. (1993). Studies of the role of the propeptides of the Arabidopsis thaliana 2S albumin. *Plant Physiology*, **102**, 425-433.

Fearon, D.T., Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. **272**, 50-53.

Fontana, A., Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., Zambonin, M. (1986). Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry*. **25**, 1847–1851.

García Buey, L., González Mateos, F., Moreno Otero, R. (2008). Interferon in hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **26**, 19-31.

Garrison, L., McDonnell, N.D. (1999). Etanercept: therapeutic use in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. **58**, I65-69.

Gekko, K., Kimoto, A., and Kamiyama, T. (2003). Effects of disulfide bonds on compactness of protein molecules revealed by volume, compressibility, and expansibility changes during reduction. *Biochemistry*. **42**, 13746-13753.

Georgiou, G., Valax, P. Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli. (1996). *Curr. Opin. Biotechnol*. **7**, 190–197.

Ghrayeb, J., Kimura, K., Takahara, M., Hsiung, H., Masui, Y and Inouye, M. (1984). Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. *Embo J*. **3**, 2437-2442.

Gibson, T.J, (1984). Studies on the Epstein-Barr virus genome. *Ph D thesis*. University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

Gillissen, G., Breuer-Werle, M. (1984). Influencia de un inmunomodulador sobre la fagocitosis en el test de clearance. *Rev Clin Esp.* **1**, 17-19.

Gokhale, R.S., Ray, S.S., Balaram, H., Balaram, P. (1999). Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry.* **38**, 423-31.

González, S., Alcaraz, M. V., Cuevas, J., Perez, M., Jaen, P., Alvarez-Mon, M., Villarrubia, V. G. (2000). An extract of the fern *Polypodium leucotomos* (Difur®) modulates Th1/Th2 cytokines balance in vitro and appears to exhibit anti-angiogenic activities *in vivo*: Pathogenic relationships and therapeutic implications. *Anticancer Research.* **20**, 1567-1575.

Gonzalez de la Peña, M.A., Monsalve, R.I., Batanero, E., Villalba, M., Rodriguez, R. Expression in *Escherichia coli* of Sin a 1 the major allergen from mustard. (1996). *Eur. J. Biochem.* **237**, 827-832.

Gonzalez-Perez, S., Vereijken, J.M., van Koningsveld, G.A., Gruppen, H., Voragen, A.G.J. (2005). Physicochemical properties of 2S Albumins and the corresponding protein isolate from sunflower (*Helianthus annuus*) *J. Food Sci.* **70**, C98-C103.

Guerrero, A., Brieva, A., Pivel, J.P. (2000). A new method for radioiodination of polysaccharides and its use in biodistribution studies of an immunomodulating glycoconjugate (Immunoferon). *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **22**(8), 621-5.

Güenechea, G., Bueren, J.A., Maganto, G., Tuduri, P., Guerrero, A., Pivel, J.P., et al. (1995). AM5, a protein-associated polysaccharide, stimulates hematopoiesis and modulates the expression of endogenous hematopoietic growth factors in murine long-term bone marrow cultures. *Stem Cells*, **13**, 175-184.

Hamblin, A.S. (1993). *Cytoquines and cytoquine receptors*. IRL Press, Oxford.

Hartley, D.L., and Kane, J.F. (1988). Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichiacoli*. *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 101–102.

Hulko, M., Lupas, A. N., Martin, J. (2007). Inherent chaperone like activity of aspartic proteases reveals a distant evolutionary relation to double-c barrel domains of AAA-ATPases. *Protein Sci.* **16**, 644–653.

Hazebrouck, S., Guillon, B., Drumare, M.F., Paty, E., Wal, J.M., Bernard, H. (2012). Trypsin resistance of the major peanut allergen Ara h 6 and allergenicity of the digestion products are abolished after selective disruption of disulfide bonds. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 548–557.

Hoffman, C. S. and Wright, A. (1985). Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 5107–5111.

Hulko, M., Lupas, A. N., Martin, J. (2007). Inherent chaperone like activity of aspartic proteases reveals a distant evolutionary relation to double-c barrel domains of AAA-ATPases. *Protein Sci.* **16**, 644–653.

Irwin, S.D., Keen, J.N., Findlay, J.B., Lord, J.M. (1990). The Ricinus communis 2S albumin precursor: a single preproprotein may be processed into two different heterodimeric storage proteins. *Mol Gen Genet.* **222** (2-3), 400-408.

Isaacs, J.D., Burrows, N., Wing, M., Keogan, M.T., Rebello, P.R., Watts, R.A., Pye, R.J., Norris, P., Hazelman, B.L., Hale, G., Waldmann, H. (1997). Humanized anti-CD4 monoclonal antibody therapy of autoimmune and inflammatory disease. *Clin Exp Immunol.* **110**, 158-166.

Janeway C, *et al.* (2005). The development and survival of lymphocytes in immunobiology: The immune system in health and disease. 6th ed. Garland Science, New York. 438, 241–316.

Johnson, D.L., Middleton, S.A., McMahon, F., Barbone, F.P., Kroon, D., Tsao, E., Lee, W.H., Mulcahy, L.S., and Jolliffe, L.K. (1996). Refolding, purification, and characterization of human erythropoietin binding protein produced in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.* **7**, 104–113.

Kadokura, H., Katzen, F., Beckwith, J. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. (2003). *Annu Rev Biochem.* **72**, 111-135.

Kane, J.F., (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* **6**, 494-500.

Kauzmann, W. (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **14**, 1–63.

Kay, A.B. (2001). Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med.* **344**, 30-7.

Kim, P.K., Deutschman, C.S. Inflammatory responses and mediators. (2000). *Surg Clin North Am.* **80**, 885-894.

King, T.P., Hottman, D., Lowenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A.E., Thomas, W. (1994). Allergen nomenclature. *Bull World Health Organ.* **72**, 797-806

Kipryanov, S.M., Moldenhauer, G., Little, M. High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. (1997). *J Immunol Methods.* **200**, 69–77.

Kujawski, L.A., Talpaz, M. (2007). The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 459-471.

- Koppelman, S.J., Nieuwenhuizen, W.F., Gaspari, M., Knippels, L.M., Penninks, A.H., Knol, E.F., Hefle, S.L., de Jongh, H.H. (2005). Reversible denaturation of Brazil nut 2S albumin (Ber e1) and implication of structural destabilization on digestion by pepsin. *J Agric Food Chem.* **53** (1), 123-131.
- Krzyzaniak, A., Burova, T., Haertle, T., Barciszewski, J. (1998). The structure and properties of Napin-seed storage protein from rape (*Brassica napus* L.). *Food/Nahrung.* **42**, 201-204.
- Lacosta Nicolas, J.L., Martinez Iniguez, J.C. (1998). Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A bibliographic review. *Rev Clin Esp.* **198**, 234-236.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227** (5259), 680-685.
- Larrad, L., Benito, R., Lasier, M.P., Spreafico, M., Gómez Lus, R. (1985). Efecto de AM3 (Imunoforon®) sobre la capacidad microbici da de macrófagos esplénicos de conejo en la infección provocada por *Brucella abortus*. *Infectología.* **1**, 38-40.
- Lebedev, K. A., Ponyakina, I. D. (2006). New Immunology of Pattern Recognition Receptors. *Biology Bulletin.* **33**, 417-426.
- LeGendre, N. & Matsudaira, P. (1988). Direct protein microsequencing from Immobilon-P transfer membrane. *BioTechnique.* **6**, 154-159.
- Lehmann, K., Hoffmann, S., Neudecker, P., Suhr, M., Becker, W.M., Rösch, P. High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2. (2003). *Protein Expr. Purif.* **31**, 250–259.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* **186**, 973–983.

Lim, S.H., Beers, S.A., French, R.R., Johnson, P.W., Glennie, M.J., Cragg, M.S. (2010). Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*. **95**, 135-143.

Lobley, A., Whitmore, L., Wallace, B.A. (2002). DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics*. **18**, 211–212.

Lockshon, D. & Morris, D.R. (1983). Positively supercoiled plasmid DNA is produced by treatment of *Escherichia coli* with DNA gyrase inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **11** (10), 2999-3017.

Loertscher, R. (2002). The utility of monoclonal antibody therapy in renal transplantation. *Transplant Proc.* **34**, 797-800.

Matsuuchi, L. and Gold, M.R. (2001). New views of BCR structure and organization. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 270-277.

Mao, D., Wachter, E., Wallace, B.A. (1982). Folding of the H⁺-ATPase Proteolipid in Phospholipid Vesicles. *Biochemistry*. **21**, 4960-4968.

Marley, J., Lu, Min., Bracken, C. (2001). A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *Journal of Biomolecular NMR*. **20**, 71-75.

Martin, F. and Kearney, J.F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 195-201.

Maxwell, A. (1993). The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol Microbiol.* **9**(4), 681-686.

McDermott, D.F. (2009). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*. **115**, 2298-2305.

- Mease, P.J. (2002). Etanercept: a new era in the treatment of psoriatic arthritis. *Am J Manag Care*. **8**(6), S181-193.
- Medzhitov, R., Janeway C. Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med*. **343**(5), 338-344.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature*. **338**, 394-397.
- Menendez-Arias, L., Dominguez, J., Moneo, I., Rodriguez, R. (1990). Epitope mapping of the major allergen from yellow mustard seeds, Sin a I. *Mol. Immunol*. **27**, 143-150.
- Messens, J. and Collet, J.F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol*. **38**, 1050-1062.
- Meyer, J.P., Persad, R., Gillatt, D.A. (2002). Use of bacille Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Postgrad Med J*. **78**, 449-454.
- Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Miller, W.O., Brant, O.A., Flory, P.J. (1967). Random coil configuration of polypeptide copolymers. *J. Mol. Biol*. **23**, 67-80.
- Miroux, B., Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*. **260**, 289–298.
- Molina, M.A., Avilés, F.X., Querol, E. (1992). Expression of a synthetic gene encoding potato carboxypeptidase inhibitor using a bacterial secretion vector. *Gene* **116** (2), 129-138.

- Monera, O.D., Kay, C.M., Hodges, R.S. (1994). Electrostatic interactions control the parallel and antiparallel orientation of α -helical chains in two-stranded α -helical coiled-coils. *Biochemistry*. **33**, 3862-387.
- Monsalve, R.I., Gonzalez de la Pena, M.A., Menendez-Arias, L., Lopez-Otin, C., Villalba, M., Rodriguez, R. (1993). *Biochem. J.* **293**, 625-632.
- Moreno, F. J.; Clemente, A. (2008). 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens? *Open Biochem. J.* **2**, 16–28.
- Moreno, F.J., Maldonado, B.M., Wellner, N., Mills, E.N. (2005b). Thermostability and *in vitro* digestibility of a purified major allergen 2S albumin (Ses i 1) from white sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). *Biochim Biophys Acta*. **1752** (2), 142-153.
- Moreno, F.J., Mellon, F.A., Wickham, M.S., Bottrill, A.R., Mills, E.N. (2005a). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant *in vitro* gastrointestinal digestion. *FEBS J.* **272**, 341–352.
- Morstyn, G. (1990). The impact of colony stimulating factor on cancer chemotherapy. *Br J Haematol*, **75**, 303-307.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* **7**, 145-173.
- Mosolits, S., Nilsson, B., Mellstedt, H. (2005). Towards therapeutic vaccines for colorectal carcinoma: a review of clinical trials. *Expert Rev Vaccines*. **4**, 329-350.
- Moya, P., Baixeras, E., Barasoain, I., Rojo, J.M., Ronda, E., Alonso, M.L., Portolés, A. (1987). Inmunoferon® (AM3) enhances the activities of early-type interferon inducers and natural killer cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **9**, 243–256.

Murtagh, G. J., Archer, D. B., Dumoulin, M., Ridout, S., Matthews, S., Arshad, S. H., Alcocer, M. J. (2003). In vitro stability and immunoreactivity of the native and recombinant plant food 2S albumins Ber e 1 and SFA-8. *Clinical and Experimental Allergy*. **33**, 1147–1152.

Muzio, M., Mantovani, A. (2000). Toll-like receptors. *Microbes Infect.* **2**(3):251-255.

O'Brien, E.P., Dima, R.I., Brooks, B., Thirumalai, D. (2007). Interactions between hydrophobic and ionic solutes in aqueous guanidinium chloride and urea solutions: lessons for protein denaturation mechanism. *J Am Chem Soc.* **129** (23), 7346-7353.

O'Donnell, M.A. (2009). Optimizing BCG therapy. *Urol Oncol.* **27**, 325-328.

Orruno, E., Morgan, M. R. A. (2011). Resistance of purified seed storage proteins from sesame (*Sesamum indicum* L.) to proteolytic digestive enzymes. *Food Chemistry*. **128**, 923–929.

Otegui, M.S., Herder, R., Schulze, J., Jung, R., Staehelin, L.A. (2006). The proteolytic processing of seed storage proteins in Arabidopsis embryo cells starts in the multivesicular bodies. *Plant Cell*. **18**(10), 2567-2581.

Pantoja-Uceda, D., Bruix, M., Giménez-Gallego, G., Rico, M., Santoro, J. (2003). Structure of RicC3, a 2S Albumin Storage Protein from *Ricinus communis*. *Biochemistry*. **42**, 13839-13847.

Pantoja-Uceda, D., Palomares, O., Bruix, M., Villalba, M., Rodríguez, R., Rico, M., Santoro, J. (2004). Solution structure and stability against digestion of rproBnIb, a recombinant 2S albumin from rapeseed: relationship to its allergenic properties. *Biochemistry*. **43**(51), 16036-16045.

Peränen, J., Rikkinen, M., Hyvönen, M., Kääriäinen, L. (1996). T7 vectors with modified T7lac promoter for expression of proteins in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **236**, 371-373.

Parienti, J.J. (2002). Cytokine therapy or structured treatment interruptions in HIV infection: which is best? *Expert Opin Pharmacother.* **3**, 719-726.

Patil, U.S., Jaydeokar, A.V., Bandawane, D.D. (2012). Immunomodulators: a pharmacological review. *Int J Pharm Pharm Sci.* **4**, 30-36.

Perez-Garcia, R., Perez-Garcia, A., Verbeelen, D., Bernstein, E.D., Villarrubia, V.G., Alvarez-Mon, M. (2002). AM3 (Immunoferon) as an adjuvant to hepatitis B vaccination in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **61**, 1845-1852.

Pfeifer, S., Bublin, M., Dubiela, P., Hummel, K., Wortmann, J., Hofer, G., Keller, W., Radauer, C., Hoffmann-Sommergruber, K. (2015). Cor a 14, the allergenic 2S albumin from hazelnut, is highly thermostable and resistant to gastrointestinal digestion. *Mol Nutr Food Res.* **0**, 1-10.

Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-1- and type II-interferon mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* **5**, 375-386.

Prieto, A., Reyes, E., Bernstein, E.D., Martinez, B., Monserrat, J., Izquierdo, J.L., Callol, L., de Lucas, P., Alvarez-Sala, R., Alvarez-Sala, J.L., Villarrubia, V.G., Alvarez-Mon, M. (2001). Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (Immunoferon[®]). *Am J Respir Crit Care Med.* **163**(7), 1578-1583.

Provencher, S.W. and Glockner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37.

Real, A., Guenecheam, G., Buerenm, J.A., Maganto, G. (1992). Radioprotection mediated by the haemopoietic stimulation conferred by AM5: a protein-associated polysaccharide. *Int J Radiat Biol.* **62**, 65-72.

Reyes, E., Prieto, A., De la Hera, A., De Lucas, P., Álvarez-Sala, R., Álvarez-Sala, J.L., et al. (2006). Treatment with AM3 restores defective T-cell function in COPD patients. *Chest*. **129**, 527-35.

Robotham, J.M., Wang, F., Seamon, V., Teuber, S.S., Sathe, S.K., Sampson, H.A., Beyer, K., Seavy, M., Roux, K.H. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. (2005). *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 1284–1290.

Rojo, J.M., Rejas, M.T., Ojeda, G., Portoles, P., Barasoain, I. (1986). Enhancement of lymphocyte proliferation, interleukin-2 production and NK activity by Immunoferon (AM-3), a fungal immunomodulator: variations in normal and immunosuppressed mice. *Int J Immunopharmacol.* **8**, 593–597.

Rozkov, A., Larsson, Bert., Björnstedt, R., Strömberg, P., Lindqvist, F., and Schweikart, Fritz. (2006). Cost-effective production of labeled recombinant proteins in *E. coli* using minimal medium. *Microbial Cell Factories*. **5**(1), P44.

Rundqvist, L., Tengell, T., Zdunek, J., Björn, E., Schleucher, J., Alcocer, M.J.C., Larsson, G. (2012). Solution structure, copper binding and backbone dynamics of recombinant Ber e 1 – the major allergen from brazil nut. *PLoS ONE* **7**, e46435.

Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Bracioni F, Rea F, Cavallero, G., Tropeano, G., Mapp, C.E., Maestrelli, P., Ciaccia, A., Fabbri, L.M. (1999). CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. **160**, 711-717.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). Plasmid and their usefulness in molecular cloning. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride (Protocol 25). *Molecular cloning: a laboratory manual*, (3^a ed). Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sanger, F. & Coulson A.R. (1978). The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Letters*. **87**, 107-110.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463.

Schägger, H. and Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

Schein, C.H. and Noteborn M.H.M. (1988). Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* is Favored by Lower Growth Temperature. *Nature Biotechnology*. **6**(3), 291-294.

Schellman, J. A. (2002). Fifty years of solvent denaturation. *Biophys. Chem.* **96**, 91–101.

Scheurer, S., Lauer, I., Foetisch, K., San Miguel Moncin, M., Retzek, M., Hartz, C., Enrique, E., Lidholm, J., Cistero-Bahima, A., Vieths, S. (2004). Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol.* **114**, 900-907.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* **75**, 163-189.

Sharief, F.S. & Li, S.S. (1982). Amino acid sequence of small and large subunits of seed storage protein from *Ricinus communis*. *J Biol Chem.* **257** (24), 14753-9.

Shreffler, W.G., Lencer, D.A., Bardina, L., Sampson, H.A. (2005). IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**, 893-899.

Sirvent, S., Palomares, O., Cuesta-Herranz, J., Villalba, M., & Rodriguez, R. (2012). Analysis of the structural and immunological stability of 2S albumin, nonspecific lipid transfer protein, and profilin allergens from mustard seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **60**, 6011–6018.

Slos, P., Speck, D., Accart, N., Kolbe, H.V., Schubnel, D., Bouchon, B., Bischoff, R., Kieny, M.P., (1994). Recombinant cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*: high-level secretion, purification and characterization. *Protein Expr. Purif.* **5**, 518–526.

Smith, D., Montie, J., Sandler, H. (2008). Carcinoma of the bladder. In: Abeloff M, Armitage J, Niederhuber J, Kastan M, McKenna W, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone.

Sobradillo, V., Miravittles, M., Gabriel, R., Jiménez-Ruiz, C.A., Villasante, C., Masa, J.F., Viejo, J.L., Fernández-Fau, L. (2000). Geographical variations in prevalence and under-diagnosis of COPD. Results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest.* **118**, 981-989.

Sorensen, H.P. and Mortensen K.K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* **4**(1): 1.

Speicher, D.W. (1998). Characterization of protein primary structure. *Dev. Biol. Stand.* **96**, 27-28.

Sreerema, N. and Woody, R.W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209**, 32-44.

Stader, J.A. and Silhavy, T.J. (1990). *Meth. Enzymol.* **185**, 166–187.

Stewart, E.J., Aslund, F., Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* **17**, 5543–5550.

Stewart, J.H., Levine, E.A. (2011). Role of bacillus Calmette-Guérin in the treatment of advanced melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* **11**, 1671-1676.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J. J., Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology.* **185**, 60-89.

Talmadge, J.E. (1998) Pharmacodynamic aspects of peptide administration biological response modifiers. *Adv Drug Deliv Rev.* **33**, 241-252.

Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **23**, 121-282.

Teuber, S.S., Dandekar, A.M., Peterson, W.R., Sellers, C.L. Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. (1998). *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 807–814.

Tomar, P.P., Chaudhary, N.S., Priyadarshi, P., Gahloth, D., Patel, G.K., Selvakumar, P., Kumar, P., Sharma, A.K. (2014a). Purification, characterisation and cloning of a 2S albumin with DNase, RNase and antifungal activities from *Putranjiva roxburghii*. *Appl Biochem Biotechnol.* **174** (2), 471-482.

Tomar, P.P., Nikhil, K., Singh, A., Selvakumar, P., Roy, P., Sharma, A.K. (2014b). Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. *Biochem Biophys Res Commun.* **448**(4), 349-354.

Towbin, H.; Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.

Uhlin, B.E. & Nordström. K. (1985). Preferential inhibition of plasmid replication in vivo by altered DNA gyrase activity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **162**(2), 855-857.

Van Stokkum, I.H.M., Spoelder, H.J.W., Bloemendal, M., Van Grondelle, R., Groen, F.C.A. (1990). Estimation of protein secondary structure and error analysis from CD spectra. *Anal. Biochem.* **191**, 110-118.

Vashishta, A., Sahu, T., Sharma, A., Choudhary, S. K., Dixit, A. (2006). In vitro refolded napin-like protein of *Momordica charantia* expressed in *Escherichia coli* displays properties of native napin. *Biochim Biophys Acta.* **1764**, 847–855.

Villarrubia, V.G., G. Calvo, C., Sada, G. (1996). Las nuevas vacunas y la respuesta inmunológica. II. El entorno de la presentación antigénica. Adyuvantes como inductores de linfocitos T-inductores de respuestas de mediación celular. *Med Clin* **107**, 185-196.

Villarrubia, V.G., Moreno Koch, M.C., Calvo, C., González, S., Alvarez-Mon, M. (1997). The immunosenescent phenotype in mice and humans can be defined by alterations in the natural immunity reversal by immunomodulation with oral AM3. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **19**, 53-74.

Villarrubia, V.G., Sada, G., Sozzani, S., et al. (1987). AM3 (Immunoferon®) restaura las actividades de macrófagos y de células NK en ratones inmunocomprometidos. *Oncología.* **10**, 283-291.

Vissers, Y. M., Blanc, F., Skov, P. S., Johnson, P. E., Rigby, N. M., Przybylski-Nicaise, L., Bernard, H., Wal, J.M., Ballmer-Weber, B., Zuidmeer-Jongejan, L., Szépfalusi, Z., Ruinemans-Koerts, J., Jansen, A.P., Savelkoul, H.F., Wichers, H.J., Mackie, A.R., Mills, C.E., Adel-Patient, K. (2011). Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S albumins (Ara h 2/6) from Peanut. *Plos One.* **6** (8), 1–9.

Waugh, D.S. (2011). An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr.Purif.* **80**, 283–293.

- Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* **32**, 668–673.
- Wilkins, M.R., Ou, K., Appel, R.D., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Golaz, O., Farnsworth, V., Cartier, P., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., Gooley, A.A. (1996). Rapid protein identification using N-terminal "sequence tag" and amino acid analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**, 609-613.
- Wishart, D., Willard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R., and Sykes, B. (2003). Program Vadar, Faculty of Pharmacy University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Wolfson, J.S., Hooper, D.C., Swartz, M.N., Swartz, M.D., McHugh, G.L. (1983). Novobiocin-induced elimination of F'lac and mini-F plasmids from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **156** (3), 1165-1170.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**, 103-119.
- Youle, R. J., Huang, A.H.C. (1978). Evidence that the castor bean allergens are the albumin storage proteins in the proteins bodies of castor bean. *Plant Physiol.* **61**, 1040–1042.

ANEXO

8. ANEXO

Estructura tridimensional de rAM55

La disponibilidad de rAM55 marcada isotópicamente con ^{15}N ha hecho posible que durante el desarrollo de esta tesis se haya determinado su estructura tridimensional mediante RMN. Dicho trabajo ha sido llevado a cabo en el laboratorio del Prof. Manuel Rico, del Instituto de Química-Física “Rocasolano” del CSIC (Madrid), en colaboración con nuestro equipo de investigación.

rAM55 representa el primer miembro de la familia de las albuminas 2S cuya estructura tridimensional ha sido perfectamente definida a nivel atómico, por lo que ha servido como modelo de referencia a la hora de realizar la predicción de estructura de otras albuminas y proteínas homólogas. Anteriormente se había establecido por RMN la estructura de la napina BnIb purificada a partir de la semilla de colza (PDB: 1PNB) (Rico *et al.*, 1996). Sin embargo, la presencia de diversas isoformas en la muestra impidió realizar una asignación secuencial con la resolución suficiente como para permitir ofrecer una estructura inequívoca, por lo que sólo se pudo adelantar el plegamiento global de la proteína nativa. Tras el establecimiento a alta resolución de la estructura de rAM55 (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003) se han resuelto las estructuras de otras cinco albuminas: la proalbumina de colza rproBnIb (PDB: 1SM7) (Pantoja-Uceda *et al.*, 2004a), la albumina de girasol SFA8 (PDB: 1S6D) (Pantoja-Uceda *et al.*, 2004b), la albumina de cacahuete Ara h 6 (PDB: 1W2Q) (Lehmann *et al.*, 2006), la albumina de alcaparra de Yunnan mabinlin II (PDB: 2DS2) (Li *et al.*, 2008) y la albumina de nuez de Brasil Ber e 1 (PDB: 2LVF) (Rundqvist *et al.*, 2012). En todos los casos, la estructura global concuerda bastante bien con el patrón general descrito para rAM55, lo que eleva a estructura prototipo la calculada a partir de los trabajos recogidos en esta tesis.

Finalmente, no cabe duda de que la determinación de la estructura tridimensional de rAM55 ha supuesto el primer paso para poder identificar aquellas regiones de la estructura responsables de su actividad farmacológica, lo que a su vez puede abrir las puertas a la posibilidad de introducir modificaciones que mejoren las propiedades inmunomoduladoras de Inmunoferon[®].

